

**LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
VETERINARIJOS AKADEMIJA**

Veterinarijos fakultetas

Kipras Narbutas

***Escherichia coli* išskyrimas iš sveikų šunų ir
sergančių virškinamojo trakto ligomis**

**Isolation of *Escherichia coli* from healthy canine and
with gastrointestinal disease**

Veterinarinės medicinos vientisųjų studijų
MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

Darbo vadovas: prof. dr. Jūratė Šiugždaitė

Kaunas, 2016

**DARBAS ATLIKTAS UŽKREČIAMŲJŲ LIGŲ KATEDROJE
PATVIRTINIMAS APIE ATLIKTO DARBO SAVARANKIŠKUMĄ**

Patvirtinu, kad įteikiamas magistro baigiamasis darbas „*Escherichia coli* išskyrimas iš sveikų šunų ir sergančių virškinamojo trakto ligomis“.

1. Yra atliktas mano paties/pačios;
2. Nebuvo naudotas kitame universitete Lietuvoje ir užsienyje;
3. Nenaudojau šaltinių, kurie nėra nurodyti darbe, ir pateikiu visą panaudotos literatūros sąrašą.

(data)

(autorius vardas, pavardė)

(parašas)

**PATVIRTINIMAS APIE ATSAKOMYBĘ UŽ LIETUVIŲ KALBOS
TAISYKLINGUMĄ ATLIKTAME DARBE**

Patvirtinu lietuvių kalbos taisyklumą atliktame darbe.

(data)

(autorius vardas, pavardė)

(parašas)

MAGISTRO BAIGIAMOJO DARBO VADOVO IŠVADOS DĖL DARBO GYNIMO

(data)

(darbo vadovo vardas, pavardė)

(parašas)

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS APROBUOTAS KATEDROJE

(aprobacijos data)

(katedros vedėjo/jos vardas pavardė)

(parašas)

Magistro baigiamojo darbo recenzentai

1)

2)

(vardas, pavardė)

(parašas)

Magistro baigiamųjų darbų gynimo komisijos įvertinimas:

(data)

(gynimo komisijos sekretorės (-iaus) vardas pavardė)

(parašas)

TURINYS

SANTRAUKA	5
SUMMARY	6
SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1. Natūrali šunų virškinamojo trakto mikroflora	9
1.2. <i>Escherichia coli</i> charakteristika	10
1.2.1. <i>Escherichia coli</i> struktūra ir biocheminės savybės	10
1.2.2. <i>Escherichia coli</i> paplitimas	11
1.2.3. <i>Escherichia coli</i> tipai	12
1.2.4. <i>Escherichia coli</i> sukeltos ligos šunų populiacijoje	12
1.3. Bakterijų atsparumas antimikrobinėms medžiagoms	13
1.3.1. <i>Escherichia coli</i> atsparumo antibiotikams molekuliniai mechanizmai	14
2. TYRIMO METODIKA IR ORGANIZAVIMAS	17
2.1. Išmatų mėginių surinkimas ir paruošimas bakteriologiniam tyrimui	17
2.3. <i>Escherichia coli</i> išskyrimas	17
2.4. <i>Escherichia coli</i> identifikavimas. Biocheminių savybių nustatymas	18
2.4.2. Sieros vandenilio nustatymas	19
2.4.3. Šlapalo hidrolizė. Amoniako nustatymas	19
2.4.4. Angliavandenių skaidymas. Fermentinis aktyvumas	19
2.4.5. Hemolizinių savybių nustatymas	19
2.4.6. Fermento beta laktamazės nustatymas	20
2.5. Mikroorganizmų atsparumo antimikrobinėms medžiagoms nustatymas	20
3. TYRIMŲ REZULTATAI	23
3.1. <i>Escherichia coli</i> išskyrimas iš šunų tiesiosios žarnos	23
3.2. <i>Escherichia coli</i> atsparumo antimikrobinėms medžiagoms nustatymas	23
3.2.1. Streptomicino poveikis <i>Escherichia coli</i> kontrolinėje ir sergančių grupėse	23
3.2.2. Cefaleksino poveikis <i>Escherichia coli</i> kontrolinėje ir sergančių grupėse	24
3.2.3. Ampicilino poveikis <i>Escherichia coli</i> kontrolinėje ir sergančių grupėse	25

3.2.4. Amoksicilino su klavulano rūgštimi poveikis <i>Escherichia coli</i> kontrolinėje ir sergančių grupėse	26
3.2.5. Cefovecino poveikis <i>Escherichia coli</i> kontrolinėje ir sergančių grupėse	27
3.2.6. Tetraciklino poveikis <i>Escherichia coli</i> kontrolinėje ir sergančių grupėse	28
3.2.7. Sulfonamidų poveikis <i>Escherichia coli</i> kontrolinėje ir sergančių grupėse	29
3.2.8. Enrofloksacino poveikis <i>Escherichia coli</i> kontrolinėje ir sergančių grupėse	29
3.2.9. Florfenikolio poveikis <i>Escherichia coli</i> kontrolinėje ir sergančių grupėse	30
3.2.10. Gentamicino poveikis <i>Escherichia coli</i> kontrolinėje ir sergančių grupėse	31
3.2.11. Benzilpenicilino poveikis <i>Escherichia coli</i> kontrolinėje ir sergančių grupėse	31
3.2.12. Bendras <i>Escherichia coli</i> atsparumas veikliosioms medžiagoms kontrolinėje ir sergančių grupėse	32
4. REZULTATŲ APTARIMAS	34
LITERATŪRA	38

SANTRAUKA

Escherichia coli išskyrimas iš sveikų šunų ir sergančių virškinamojo trakto ligomis

Kipras Narbutas

Magistro baigiamasis darbas

Tyrimo tikslas: išskirti *Escherichia coli* iš sveikų ir virškinamojo trakto ligomis sergančių šunų ir nustatyti jų atsparumą antimikrobinėms medžiagoms.

Uždaviniai: išskirti *Escherichia coli* iš sveikų ir sergančių virškinamojo trakto ligomis šunų. Nustatyti iš sveikų šunų išskirtų *Escherichia coli* daugybinį atsparumą antimikrobinėms medžiagoms. Nustatyti iš virškinamojo trakto ligomis sergančių šunų išskirtų *Escherichia coli* daugybinį atsparumą antimikrobinėms medžiagoms. Palyginti iš sveikų ir sergančių šunų išskirtų *Escherichia coli* atsparumą antimikrobinėms medžiagoms.

Metodai: Gryna *Escherichia coli* kultūra išskirta naudojant diferencines – diagnostines terpes – Drigalskio laktozės ir Levino agarus. Fermento β -laktamazės nustatymui naudojome β -laktamazės reagentą, indolo nustatymui – Erlichio reagentą, sieros vandenilio nustatymui – švino acetatą, šlapalo hidrolizės nustatymui – laksmuso popierėlį. Fermentiniam aktyvumui nustatyti naudojome margają eilę, o hemolizinių savybių nustatymui - kraujo agarą. *Escherichia coli* atsparumas antimikrobinėms medžiagoms nustatytas naudojant modifikuotą Kirby – Bauer, diskų difuzijos metodą.

Rezultatai: gauti rezultatai parodė, kad šunų sergamumas neturėjo įtakos *Escherichia coli* išskyrimui – išskyrėme šias bakterijas iš visų tirtų mėginių. *Escherichia coli* padermės, išskirtos iš kliniškai sveikų šunų, pasižymėjo daugybinio atsparumu: streptomycinui (20 proc.), ampicilinui (40 proc.), cefovecinui (30 proc.), tetraciklinui (10 proc.), gentamicinui (30 proc.), benzilpenicilinui (100 proc.). *Escherichia coli* padermės, išskirtos iš sveikų šunų, buvo neatparios cefaleksinui, amoksicilinui su klavulano rūgtimi, sulfonamidams, enrofloksacinui, florfenikoliui. *Escherichia coli* padermės, išskirtos iš sergančių šunų, pasižymėjo daugybinio atsparumu: streptomycinui (20 proc.), cefaleksinui (50 proc.), ampicilinui (60 proc.), amoksicilinui su klavulano rūgštimi (50 proc.), cefovecinui (30 proc.), tetraciklinui (40 proc.), sulfonamidams (20 proc.), enrofloksacinui (40 proc.), gentamicinui (40 proc.), benzilpenicilinui (90 proc.). *Escherichia coli* padermės, išskirtos iš sergančių šunų, buvo neatparios tik florfenikoliui.

Raktiniai žodžiai: *Escherichia coli*, šuo, atsparumas, antimikrobinės medžiagos.

SUMMARY

“Isolation of *Escherichia coli* from healthy canine and with gastrointestinal disease”

Kipras Narbutas

Master thesis

Aim of investigation: to isolate *Escherichia coli* from healthy and with gastrointestinal disease canine and determine antimicrobial resistance.

Objectives: to isolate *E. coli* from healthy and with gastrointestinal disease canine. Determine multiple antimicrobial resistances from healthy dogs. Determine multiple antimicrobial resistances from canine with gastrointestinal disease. Compare isolated *E. coli* antimicrobial resistance from healthy and diseased dogs.

Methods: a pure culture of *E. coli* isolated using differential – diagnostic media – Drigalski lactose and Levine agars. β – lactamase was determined with β -lactamase reagent, indole – with Ehrlich reagent, hydrogen sulfide – with lead acetate, urea hydrolysis determined with litmus paper. Enzymatic activity determined with a variegated line test and hemolytic properties determined with blood agar. *E. coli* antimicrobial resistance determined using a modified Kirby - Bauer disk diffusion method.

Results: the results showed that canine morbidity did not affect isolation of *E. coli* – we isolated these bacteria from all analyzed samples. *E. coli* strains isolated from healthy dogs characterized multidrug resistance for streptomycin (20 %), ampicillin (40 %), cefovecin (30 %), tetracycline (10 %), gentamicin (30 %), benzylpenicillin (100 %). *E. coli* in healthy dogs were not resistant for cephalexin, amoxicillin with clavulanic acid, sulfonamides, florfenicol. *E. coli* strains isolated from diseased dogs, characterized multidrug resistance for streptomycin (20 %), cephalexin (50 %), ampicillin (60 %), amoxicillin with clavulanic acid (50 %), cefovecin (30 %), tetracycline (40 %), sulfonamides (20 %), enrofloxacin (40 %), gentamicin (40 %), benzylpenicillin (90 %). *E. coli* strains in diseased dogs were not resistant for florfenicol.

Key words: *Escherichia coli*, dog, resistance, antimicrobial materials.

SANTRUMPOS

E. coli – *Escherichia coli*

LPS – lipopolisacharidai

Mg²⁺ – magnio jonai

Ca²⁺ – kalcio jonai

cGMP – ciklinis guanino monofosfatas

ESBL - Extended-spectrum- β -lactamase – plataus spektro β -laktamazės

IVADAS

Įvairias infekcines ligas sukelia mikroorganizmai, kuriems būdingas greitas dauginimasis bei prisitaikymas prie esančių aplinkos sąlygų. Viso pasaulio mokslininkų, veterinarinės ir medicinos gydytojų uždavinys – kovoti su užkrečiamųjų ligų sukėlėjais (18).

Escherichia coli yra natūrali žarnyno mikroflora, kolonizavusi žinduolių storąją žarną ir apatinę plonosios žarnos dalį. Šios bakterijos į aplinką yra išskiriamos su išmatomis, o išmatose, dulkėse ar vandenyje gali išgyventi savaites ar mėnesius (10). Į organizmą *E. coli* patenka fekalinio – oralinio būdu. Patekusios *E. coli* išskiria labai specializuotus adhezinus bei platų spektrą endotoksinų, kurie lemia šios bakterijos įsitvirtinimą ir patogeniškumą (6).

Pasauliniai tyrimai rodo (12-14), kad šunų virškinamo trakto ligas bei viduriavimą dažniausiai sukelia enterotoksikogeninės ir enteropatogeninės *E. coli* bakterijos. *E. coli* sukeltos ligos gydomos naudojant antimikrobinius preparatus.

Plačiai naudojant antibiotikus praktikoje, mikroorganizmai, sugebėdami greitai prisitaikyti prie aplinkos sąlygų įgauna įvairius atsparumo antibiotikams mechanizmus (15,19-26). Esant tokiai situacijai, kai bakterijos turi atsparumą antimikrobinei medžiagai, užkrečiamosios ligos gydymas tampa sudėtingas, nes skiriami medikamentai gali būti neveiksmingi (17). Įprastomis vaistų dozėmis nesunaikinami atsparūs organizmai dėl gebėjimo greitai daugintis, perduoda genetinę informaciją savo palikuonims. Žinoma, kad žmonių laikomų augintinių skaičius nuolat auga, o dažnas žmonių ir gyvūnų kontaktas didina galimybę perduoti antimikrobinėms medžiagoms atsparias bakterijas vieni kitiems, todėl vis daugiau individų užsikrečia atspariomis mikroorganizmų padermėmis ir ligų gydymas tampa didele, opia ir sunkiai sprendžiama problema.

Remiantis tarptautinių tyrimų duomenimis (15), Europoje 2011 – 2014 m. laikotarpyje įvairiems antibiotikams atsparių *E. coli* padermių kiekis tik augo, todėl norėdami papildyti mokslines žinias, šiame darbe tyrėme *E. coli* padermių, išskirtų iš sveikų ir sergančių šunų išmatų mėginių, atsparumą antimikrobinėms medžiagoms.

Darbo tikslas: išskirti *E. coli* iš sveikų šunų ir sergančių virškinamojo trakto ligomis, ir nustatyti atsparumą antimikrobinėms medžiagoms.

Darbo uždaviniai:

1. Išskirti *E. coli* iš sveikų šunų ir sergančių virškinamojo trakto ligomis.
2. Nustatyti *E. coli* daugybinių atsparumą antimikrobinėms medžiagoms sveikų šunų grupėje.
3. Nustatyti *E. coli* daugybinių atsparumą antimikrobinėms medžiagoms sergančių šunų grupėje.
4. Palyginti *E. coli* atsparumą antimikrobinėms medžiagoms tarp sveikų ir sergančių šunų grupių.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Natūrali šunų virškinamojo trakto mikroflora

Tyrimais nustatyta, kad natūraliai šunų virškinamasis traktas nėra sterilus – jame aptinkami įvairių rūšių mikroorganizmai. Sveikų suaugusių šunų virškinamajame trakte vyrauja klostridijos, koliforminės bakterijos ir streptokokai. Kiti tyrimai rodo, kad priklausomai nuo virškinamojo trakto dalies, aptinkamos įvairios bakterijų gentys bei rūšys. Pavyzdžiui, *Clostridium perfringens*, *Micrococcus*, *Eschericia coli* aptinkama visose virškinamojo trakto dalyse. *Clostridium bifermentans (sordelli)*, *Clostridium sporogenes* aptinkama tik klubinėje žarnoje, o *Sarcina*, *Klebsiella* gentys – tik skrandyje. *Enterococcus faecalis* bakterijos bei *Bacillus* ir *Pseudomonas* gentys aptinkamos klubinėje ir tiesiojoje žarnose. *Proteus* genties atstovai – skrandyje ir tiesiojoje žarnoje. *Staphylococcus aureus* bakterijų randama dvylikapirštėje ir tiesiojoje žarnose, o α -hemolizinis streptokokas labiau būdingas skrandžiui, dvylikapirštei žarnai ir tiesiajai žarnai.

Clostridium genties atstovai virškinamajame trakte aptinkami maždaug 85 – 90 proc. atvejų, *Bacteroides* genties atstovai – maždaug 20 – 30 proc. atvejų, tačiau išmatose pastarųjų aptinkama gerokai daugiau – 75 proc. atvejų. Išmatų mėginiuose koliforminių bakterijų ir streptokokų kiekybinė išraiška taip pat yra didesnė nei virškinamojo trakto mėginiuose (1).

Žarnyno mikrofloros sudėtis priklauso nuo maisto raciono, šuns veislės ir amžiaus. Tiriant dviejų šunų grupių, kurių vienos mityba buvo kontrolinė, o kitos ėdale padidintas ląstelienos kiekis, pastebėta, kad bandyminėje šunų grupėje lyginant su kontroline grupe, pakito visi stebėti virškinamojo trakto parametrai: pH, sausųjų medžiagų, indolo ir sulfidų kiekiai padidėjo, o amoniako, acto rūgšties, propiono rūgšties, butirinės rūgšties kiekiai sumažėjo. Taip pat, palyginus tarp amžiaus grupių *Bacteroides* genties atstovų kiekį, vyresnių šunų grupėje (10,9 metų) jis buvo mažesnis nei jaunesnių (2,5 metai) šunų, tačiau laktobacilų ir bifidobakterijų skaičius žymiai nesiskyrė (2).

Apibendrinant galime teigti, kad šunų virškinamajame trakte aptinkamos šios bakterijos: *Enterobacteriaceae* šeimos atstovai (priklauso daugybė žinomų patogenų, tokių kaip *Salmonella* ar *E. coli*), *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* (simbiotiniai mikroorganizmai, gaminantys pieno rūgštį), *Bacteroides* (padeda virškinti augalinės kilmės medžiagas) ir *Bifidobacterium* (atsiranda ne nuo gimimo, o vėliau, siejamos su alergijų prevencija) genčių atstovai. Nors ešerichijos nėra viena iš dominuojančių bakterijų virškinamajame trakte, tačiau *E. coli* aptinkama visose sveikų šunų žarnyno dalyse (1,2).

1.2. *Escherichia coli* charakteristika

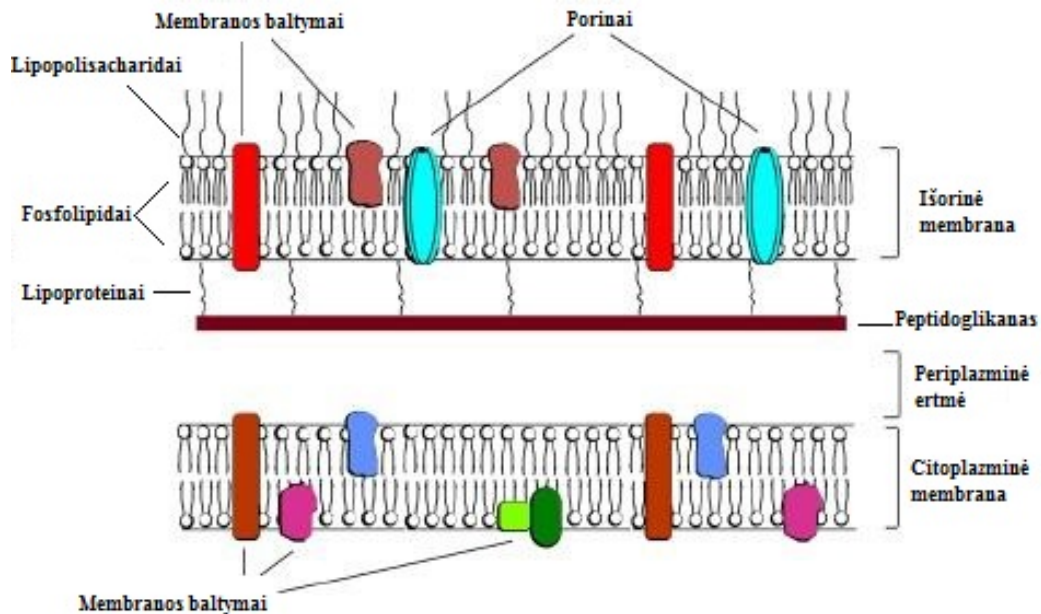
1.2.1. *Escherichia coli* struktūra ir biocheminės savybės

Escherichia coli (*E.coli*) istoriškai yra svarbus organizmas, siekiant suprasti gyvų ląstelių genetiką, biochemiją, metabolismus. *E. coli* buvo vienas pirmųjų genetiškai ištirtų organizmų, kuriam buvo nustatyta genų seka (3). Daugelis *E. coli* padermių yra svarbūs patogenai tiek gyvūnų, tiek žmonių populiacijoje (4).

E. coli priklauso *Enterobacteriaceae* šeimai. Tai – Gram neigiamos, vidutinio dydžio (0,4-0,6 x 2-3µm), lazdelės formos bakterijos, kurios gali būti judrios – žiuželiai išsidėstę aplink bakterijos paviršių įvairiomis kryptimis (toks išsidėstymas vadinamas peritrichiniu), prisitvirtinimui prie aplinkos turi pilies (5).

E. coli būdingas polimorfiškumas, tam tikros padermės turi mikrokapsulę. Kaip ir kitų gramneigiamų bakterijų, ląstelės apvalkalėlį sudaro dvi membranos: vidinė – citoplazminė membrana ir išorinė membrana, tarp kurių yra periplazminė ertmė, sudaryta iš įvairių baltymų (1 pav.). Minėtoje ertmėje yra išsidėstęs plonas peptidoglikano sluoksnis. Periplazminė ertmė ypatinga tuo, kad joje gausu įvairių baltymų: dalyvaujančių didelių makromolekulių degradacijoje (proteazių, nukleazių, fosfatazių, lipazių ir kt.), medžiagų pernašoje, sintezėje, taip pat ir baltymų, kurių veikimas lemia bakterijų natūralų atsparumą tam tikroms medžiagoms (kolagenazių, proteazių, hialuronidazių ir β-laktamazių). Išorinė membrana palaiko ląstelės struktūrą bei atlieka atrankiai pralaidaus barjero funkciją. Jos išorinėje pusėje yra lipopolisacharidų (LPS), viduje – fosfolipidų bei baltymų – porinų. Išorinės membranos struktūrą palaiko hidrofobinės sąveikos tarp LPS molekulių bei Mg^{+} ir Ca^{2+} jonų jungtys tarp LPS fosfatinių grupių. Bakterijai patekus į kitą organizmą, LPS veikia kaip endotoksinas, ir stimuliuoja šeimininko imuninę sistemą. Išorinės membranos baltymai porinai sudaro specialius kanalus, per kuriuos vyksta metabolitų ir smulkių hidrofilinių antibiotikų judėjimas, tačiau per išorinę membraną į vidų nepatenka didelės molekulinės masės arba hidrofobiniai antibiotikai (6). Vidinę – citoplazminę membraną sudaro fosfolipidai ir periferiniai bei integraliniai membranos baltymai. Ji formuoja barjerą tarp citoplazmos ir periplazmos. Medžiagos per ląstelės membranas gali judėti keliais būdais: difuzijos, palengvintos difuzijos, aktyviosios pernašos ir transporto pūslelių viduje. Visi baltymai, kurie daro įtaką membranos laidumui, skirstomi į tris klases – siurblius, nešiklius ir kanalus. Pažymėtina tai, kad mikroorganizmų atsparumą antimikrobinėms medžiagoms, be kitų priežasčių, gali lemti antimikrobinių medžiagų išstūmimas dėl pastovios arba indukuojamos siurblių raiškos (7).

E. coli yra fakultatyviniai anaerobai, kurie gliukozę ne oksiduoja, o fermentuoja. Šie mikroorganizmai turi katalazę ir neturi oksidazės, redukuoja nitratus iki nitritų ir gali daugintis paprastose terpėse esant + 37 °C temperatūrai, tokiose kaip mitybinis agaras (5).



1 pav. *E. coli* sienelės struktūra (8)

1.2.2. *Escherichia coli* paplitimas

E. coli aptinkamos skirtinguose aplinkos komponentuose: dirvožemyje, vandenyje, taip pat gyvuose organizmuose (įskaitant augalus, žmones ir gyvūnus). Šią bakteriją galima išskirti iš šaltakraujų stuburinių organizmo, tačiau žymiai dažniau ji sutinkama šiltakraujų gyvūnų organizme. Daugelis *E. coli* yra nepatogeniškos, sudaro 0,1 proc. šeimininko natūralios mikrofloros. Natūraliai žarnyne *E.coli* kaip mikrofloros dalis sintetina E, K₂, B grupės vitaminus bei slopina kitų patogeninių bakterijų dauginimąsi. Pastebėtina tai, kad netgi kūno dydis ir žarnyno morfologija turi įtakos tikimybei aptikti *E. coli* tarp paukščių ir žinduolių. Tikimybė paukščiuose ir mėsėdžiuose gyvūnuose aptikti *E. coli* bakterijas didėja priklausomai nuo šeimininko kūno dydžio. Ši priklausomybė siejama su ryšiu tarp kūno masės ir žarnyno perėjimo laiko. Žarnyno morfologija taip pat turi įtakos: pavyzdžiui, vabzdžiaėdžiai šikšnosparniai turi santykinai mažą nediferencijuotą, į vamzdelį panašų žarnyną, o tokio paties dydžio graužikai turi gerai diferencijuotą žarnyną su akląją žarna, todėl *E. coli* žymiai rečiau aptinkama šikšnosparnių nei graužikų organizme (5,9).

E. coli yra natūraliai kolonizavusi žinduolių storąją žarną ir apatinę plonosios žarnos dalį. Didesnės bakterijų populiacijos aptinkamos mėsėdžių ir visaėdžių nei žolėdžių organizme. *E. coli* yra išskiriamos į aplinką su išmatomis, o išmatose, dulkėse ar vandenyje gali išgyventi savaites ar mėnesius (10). Iš išorės fekaliniu – oraliniu būdu per burną patekusios *E. coli* išskiria labai specializuotus adhezinus bei platų spektrą endotoksinų, kurie lemia šios bakterijos įsitvirtinimą ir patogeninę (6).

1.2.3. *Escherichia coli* tipai

Ešerichijų antigeninė struktūra yra sudėtinga. Ją sudaro lipopolisacharidų O antigenas (termostabilus), paviršinis somatinis K antigenas (kapsulinis, termolabilus) ir žiuželinis H antigenas (termolabilus). Pagal skirtingus autorius, remiantis antigeniniais skirtumais, ešerichijos skirstomos į 5 pagrindines grupes: enterotoksines, enteropatogenines, enteroinvazines, enterohemoragines, enteroagregacines ir enteroadhezines (6,10-12).

Enterotoksinė *E. coli* sukelia viduriavimus, paprastai be temperatūros pakilimo. Tokios bakterijos išskiria adhezinus, kurie leidžia joms prisitvirtinti prie plonosios žarnos enterocitų. Šios grupės *E.coli* gamina du baltyminės kilmės enterotoksinius: termolabilų enterotoksina, savo struktūra ir funkcija panašų į choleros toksina, ir termostabilų enterotoksina, sukeliantį cGMP kaupimąsi tam tikrose ląstelėse, o vėliau – skysčių ir elektrolitų sekreciją į žarnyno spindį. Šios padermės yra neinvazinės (nepatenka į ląstelių vidų), tačiau įprastai nepasišalina iš žarnyno (4,6,10,11).

Kaip ir enterotoksinė, enteropatogeninė *E. coli* sukelia viduriavimus, tačiau skiriasi jų molekuliniai kolonizavimo mechanizmai bei etiologija. Šios grupės bakterijos negamina enterotoksinių, bet prisitvirtina prie žarnų ląstelių dėka adhezino, vadinamo intiminu. Enteropatogeninė *E. coli* turi patogeniškumo veiksnių, kurie labai panašūs į *Shigella* genties bakterijų – gali gaminti šiga toksina. Prisitvirtinus prie žarnų enterocitų, skatinamas aktino sugrįžimas į ląstelę, dėl to sukeliamas jos deformacija. Enteropatogeninės *E. coli* yra vidutiniškai invazinės (t.y. gali patekti į ląstelę) ir sukelti uždegiminę reakciją (4,6,10,11).

Enteroinvazinė *E. coli* paprastai randama tik žmonių organizme, sukelia simptomus, primenančius šigeliozę (gausus viduriavimas ir aukšta temperatūra) (4,6).

Enterohemoraginė *E. coli* dažniausiai sutinkama padermė – O157:H7, sukelianti viduriavimą su kraujo priemaiša (be karščiavimo). Šios bakterijos gali sukelti hemolizinį – ureminį sindromą ir staigų inkstų nepakankamumą. Būdingiausia žmonėms, ožkoms ir galvijams (6,10).

Enteroagregacinė *E. coli* grupė neinvazinė. Ši grupė taip pavadinta dėl fimbrijų, leidžiančių agreguotis prie audinių ląstelių, sukeliančių vandeningą viduriavimą, nelydimą karščiavimo. Enteroagregacinės *E. coli* produkuoja hemoliziną ir termostabilų enterotoksina, panašų į produkuojamą enterotoksinių *E.coli* grupėje (4,6,10,11).

1.2.4. *Escherichia coli* sukeliamos ligos šunų populiacijoje

Šiame darbe bus nagrinėjamos atsparios antimikrobinėms medžiagoms *E. coli* padermės išskirtos iš šunų išmatų, todėl reikėtų skirti dėmesio *E. coli* vietai šunų populiacijoje. Dažniausiai *E. coli* šunų populiacijoje sukelia:

- Žarnyno ligas bei viduriavimą (13), kurį lemia enteropatogeninių bakterijų išskiriami enterotoksinais (12) bei enterotoksikogeninės *E. coli* grupės atstovų išskiriami termostabilūs enterotoksinais (14);
- Naujagimių šuniukų tarpe *E. coli* dažniausiai sukelia koliseptisemiją – pasireiškia kraujo užkrėtimas, eiga dažniausiai letali;
- Kalėms dažniausiai sukelia gimdos uždegimą. Tai siejama su progesterono stimuliuojama gimdos gleivine. Uždaros gimdos piometros atveju kalei pasireiškia toksemija. Eigoje dalyvauja ir *E. coli* išskirtas endotoksinas;
- Suaugusiems šunims (neretai kalėms) *E. coli* dažniausiai sukelia šlapimo pūslės uždegimą, tačiau ilgesnės infekcijos atveju, *E. coli* gali pakilti šlapimo takais;
- Be šių ligų, *E. coli* taip pat gali sukelti prostatitą, vaginitą, perinatalines infekcijas, išorinės ausies uždegimus, širdies-kraujagyslių sistemos uždegimus, endotoksemiją (12).

1.3. Bakterijų atsparumas antimikrobinėms medžiagoms

Atsparumas - reiškinys, kai organizmai ir jų palikuonys geba laikinai arba visam gyvavimo laikotarpiui išlikti gyvybingi ir/arba daugintis esant sąlygoms, naikinančioms arba slopinančioms kitus tos pačios padermės atstovus. Bakterijos laikomos atspariomis, jeigu jų neveikia įprastai praktikoje naudojama antibakterinės medžiagos koncentracija (15).

Netinkamas antimikrobinių medžiagų vartojimas yra priežastis, didinanti mikroorganizmų atsparumą. Netinkamai parinktų ar netinkamos koncentracijos antibiotikų poveikyje, mikroorganizmai ne tik išlieka gyvybingi, bet tuo pačiu įgauna atsparumą naudojamiems preparatams. Įtakos turi ne tik preparato koncentracija ar tinkamas jo parinkimas, bet ir vartojimo laikas – jis turi būti nei per trumpas, nei per ilgas (16).

2015 m. lapkričio mėn. EARS-Net ataskaitoje skelbiama, kad 2014 m. Europoje mikroorganizmų atsparumas antibiotikams buvo mažesnis šiauriniame regione, lyginant su šalimis, esančiomis rytų ir pietų Europoje. Šie skirtumai yra susiję su skirtingu antimikrobinių medžiagų naudojimu bei infekcinių ligų kontroliavimu (17).

Pastaraisiais metais gram neigiamų bakterijų padermių, atsparių įvairiems antibiotikams, kiekis tik didėja. Tarptautiniai tyrimai (18) parodė, kad daugelyje pasaulio šalių ypatingai greitai plinta antibiotikams atsparių *E. coli* ir *K. pneumoniae* padermių atstovai, kurie apsunkina šių bakterijų sukeltų infekcinių ligų gydymą. Tokią atsparių padermių kiekio augimo tendenciją galima susieti su atsparumą lemiančių genų lokalizacija judriuosiuose genomo elementuose – transpozonuose, pernešamosiose plazmidėse bei integronuose.

Pasaulyje atlikti tyrimai (17) rodo, kad 2014 m. Europos šalyse didžiausias *E. coli* atsparumas pastebėtas aminopenicilinams (57,1 proc. (Lietuvoje 57,8 proc.)) bei fluorokvinolonams (22,4 proc. (Lietuvoje 12,8 proc.)). Taip pat, ši analizė parodė, kad 2011 – 2014 m. laikotarpyje Europoje ženkliai išaugo atsparumas trečios kartos cefalosporinams bei kombinuotam trečios kartos cefalosporinų, ampicilinų ir fluorokvinolonų poveikiui.

Didelę baimę kelia antibiotikams atsparių mikroorganizmų, kurie sukelia ligas tiek žmogui tiek gyvūnui, plitimas mitybos grandine. Bakterijų, tokių kaip *E. coli*, kurios dalyvauja atsparumą koduojančių genų pernašoje, keliavimas mitybos grandine kelia didelį pavojų visuomenės sveikatai (19).

1.3.1. *Escherichia coli* atsparumo antibiotikams molekuliniai mechanizmai

Bakterijų atsparumą antibiotikams gali sukelti skirtingi veikimo mechanizmai: ribotas antibiotikų patekimas į ląstelės vidų; aktyvus antibiotikų šalinimas iš ląstelės, panaudojant pompas; fermentinis antibakterinių medžiagų išveiklinimas arba suardymas; antimikrobinių medžiagų sujungimas ir neutralizavimas ląstelės išoriniame sluoksnyje; antibiotiko taikinio genetinės modifikacijos, silpninančios jų saveiką; padidėjusi antibiotiko taikinio – baltymo raiška. Dažnai atsparumą tam tikriems antibiotikams sukelia kelių kartu veikiančių mechanizmų kombinacija (17,20,21).

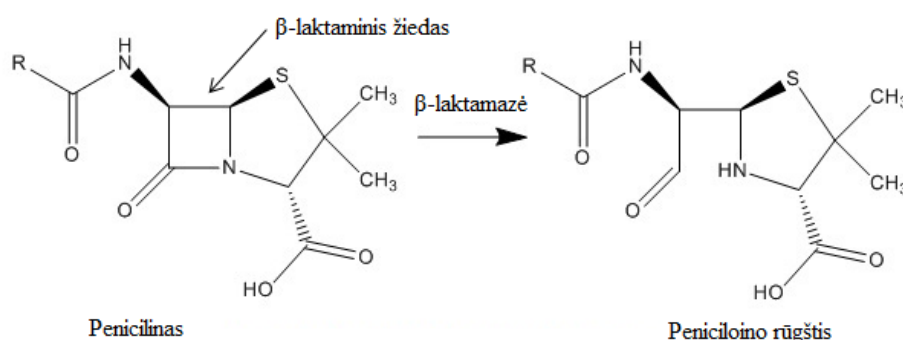
1.3.1.1. *Escherichia coli* atsparumas β -laktaminiams antibiotikams

β -laktaminiai antibiotikai – tai pati didžiausia bei plačiausia vartojamų antibiotikų grupė savo sandaroje turinti β -laktaminį žiedą. Šiems antibiotikams priskiriami I-IV kartos cefalosporinai, monobaktamai, karbepenemai, penicilinai, penicilino modifikuoti dariniai (22).

E. coli atsparumas β -laktaminiams antibiotikams pagrįstas fermentų β -laktamazių sinteze (17). Šie fermentai yra koduojami bakterijų plazmidžių genuose. Tokios plazmidės, turinčios atsparumą koduojančius genus, yra lengvai perduodamos kitoms bakterijų rūšims. β -laktamazės pagal naudojamą substratą gali būti suskirstomos į 4 dideles grupes: penicilinizės, AmpC tipo cefalosporinazės, plataus spektro β -laktamazės (ESBL) ir carbapenemazės (23). β -laktamazė jungiasi su į ląstelę patekusio antibiotiko sudėtyje esančiu β -laktaminiu žiedu ir jį suardo (24) (2 pav.).

Mokslininkai Australijoje (Warren) atliko tyrimą, kurio tikslas buvo ištirti *E. coli* atsparumą III kartos cefalosporinams. Nustatyta, kad 50 proc. tyrime dalyvavusių šunų turėjo chloramfenikoliui atsparias *E. coli* padermes (25). Taip pat, neseniai Hordijk ir kitų mokslininkų atliktame tyrime (26) nustatyta, kad 45 proc. sveikų ir 55 proc. viduriuojančių šunų turėjo atsparias

trečios kartos cefalosporinų grupės antibiotikui cefotaksimui *E. coli* padermės. Šio tyrimo PGR rezultatai parodė, kad atsparios *E. coli* turėjo AmpC ir ESBL genus. Rzewuska (27) ir kitų mokslininkų tyrimo rezultatai parodė, kad sergančių virškinamojo trakto ligomis šunų išmatose esančios *E. coli* buvo atsparios β -laktaminiams antibiotikams: amoksicilinui (50 proc.), amoksicilinui su klavulano rūgštimi (70 proc.) bei cefalosporinams: cefovecinui (20 proc.), cefotaksimui (30 proc.) bei cefuroksimui (42proc.). Aasmāe ir kiti mokslininkai (28) nustatė, kad iš 21,5 proc. tiriamųjų išskirtos *E. coli* buvo atsparios ampicilinui. Harada bei kt. (29) nustatė, kad 60,5 proc. iš sveikų tiriamųjų šunų išskirtos *E. coli* buvo atsparios ampicilinui. Cummings ir kt. (30). nustatė, kad iš 43,1 proc. sergančių virškinamojo trakto ligomis tiriamųjų išskirtos *E. coli* buvo atsparios ampicilinui. Pedersen ir kiti (31) nustatė, kad pas 3,8 proc. sergančių šunų *E. coli* buvo atsparios amoksicilinui su klavulano rūgštimi. Jungtinėse Amerikos Valstijose Cornell'o Universiteto Gyvūnų ir Sveikatos centre Cummings ir kt. (30) nustatė, kad *E. coli* atsparumas amoksicilinui ir klavulano rūgščiai buvo 15,7 proc.



2 pav. Penicilino β -laktaminio žiedo suardymas

1.3.1.2. *Escherichia coli* atsparumo fluorokvinolonams mechanizmas

Fluorokvinolonai ląstelėje jungiasi su replikaciją ir transkripciją vykdančiais baltymais DNR giraze bei izomeraze, ir slopina šių ląstelių sintezę (17,32). *E. coli* atsparumas fluorokvinolonams pagrįstas įvykusiom mutacijom specialiose DNR replikacijoje dalyvaujančių fermentų girazės ir topoizomerazės genų vietose bakterijos chromosomoje. Pakitus minėtiems baltymams, pakinta ir fluorokvinolonų galimybė prie jų prisijungti (32). Taip pat, atsparumas šiems antibiotikams įgyjamas sumažėjus išorinėje membranoje baltymų porinų - sumažėjus ląstelės membranos laidumui. Dar vienas galimas atsparumo mechanizmas - membraninius siurblius koduojančių genų sekų pakitimas, dėl ko bakterijos ląstelės membranoje padaugėja pompų, „išpumpuojančių“ iš ląstelės antimikrobinės medžiagos molekules (17,32).

Minėto Rzewuska ir kitų mokslininkų tyrimo (27) rezultatai parodė, kad sergančių šunų išmatose išskirtos *E. coli* padermės buvo atsparios fluorokvinolonų grupės antibiotikams: marbofloksacinui (20 proc.), norvofloksacinui (21 proc.) bei enrofloksacinui (40 proc.). Cummings ir kiti (30) atsparių enrofloksacinui *E. coli* padermių rado pas 18,1 proc. sergančių tiriamųjų.

1.3.1.3. *Escherichia coli* atsparumo aminoglikozidams mechanizmas

Aminoglikozidai, tokie kaip streptomocinas, gentamicinas, patekę į ląstelę jungiasi prie ribosomų ir slopina baltymų sintezę (17). Vienas iš atsparumo šiem antibiotikams mechanizmų yra veikliosios medžiagos fermentinis išveiklinimas, veikiant fermentams acetiltransferazėms, fosfotransferazėms ir nukleotidiltransferazėms (17,33). Šie fermentai prijungia arba pašalina specifines grupes prie veikliosios medžiagos molekulės, dėl ko pasikeičia jos gebėjimas veikti. Kitas, ne mažiau svarbesnis mechanizmas apima ribosomų modifikaciją – pavyzdžiui metilinimas pakeičia ribosomų gebėjimą prisijungti įprastai prijungiamą į ląstelę patekusį aminoglikozidų grupės antibiotiką (17,34). Atsparumą antimikrobinėms medžiagoms taip pat gali nulemti membraninių siurblių - pompų kiekio padidėjimas (35).

Pedersen ir kt. (31) nustatė, kad iš 22,3 proc. sergančių šunų, kuriems daryti išmatų, tiesiosios žarnos bei vidaus organų mėginių mikrobiologiniai tyrimai, išskirtos *E. coli* buvo atsparios streptomocinui. Nam ir kt. (36) savo tyrime nustatė, kad benamių šunų grupėje, atsparias streptomocinui *E. coli* padermes turinčių individų skaičius sudarė 35,8 proc., o laikomų namuose - 41,7 proc. tiriamųjų.

Minėto tyrimo (31) rezultatai parodė, kad 2,9 proc. sergančių virškinamojo trakto ligomis šunų grupėje išskirtos *E. coli* buvo atsparios gentamicinui. JAV atlikto tyrimo metu (30), atsparių gentamicinui *E. coli* padermių aptikta pas 15,5 proc. tiriamųjų šunų. Nam ir kitų mokslininkų (36) tyrimo rezultatai atskleidė, kad *E. coli* atsparumas gentamicinui pasireiškė pas 16,1 proc. benamių šunų ir pas 21,8 proc. namuose laikomų šunų.

Rzewuska ir kitų mokslininkų (27) tyrime nustatyta, kad sergančių šunų išmatose išskirtos *E. coli* padermės buvo atsparios gentamicinui (69 proc.), neomicinui (85 proc.) ir streptomocinui (98 proc.).

2. TYRIMO METODIKA IR ORGANIZAVIMAS

2.1. Išmatų mėginių surinkimas ir paruošimas bakteriologiniam tyrimui

Bakteriologiniam tyrimui mėginiai buvo imami iš sergančių ir kliniškai sveikų šunų tiesiosios žarnos, įvedant į ją sterilų tamponėlį apie 1 cm, laikantis 2009 01 22 Lietuvos Respublikos Valstybinės Maisto ir Veterinarijos tarnybos direktoriaus įsakymu priimto įstatymo reikalavimų, dėl gyvūnų skirtų eksperimentiniams ir kitiems mokslo tikslams laikymo, priežiūros ir naudojimo. Nr. B1-639. Išmatų mėginiai buvo surinkti į sterilias transportines terpes, TRANSWAB (Amies, Liofilchem, Italija).

Į laboratoriją mėginiai buvo pristatyti per 72 val. nuo jų paėmimo, o iki tol laikomi +4°C temperatūroje.

2.2. Tiriamųjų grupavimas

Tiriamieji buvo suskirstyti į dvi grupes. Pirmąją grupę sudarė virškinamojo trakto ligomis sergantys šunys, o antrąją – kontrolinę – kliniškai sveiki šunys.

Tirti buvo įvairaus amžiaus, skirtingos lyties, grynaveisliai ir mišrūnai šunys.

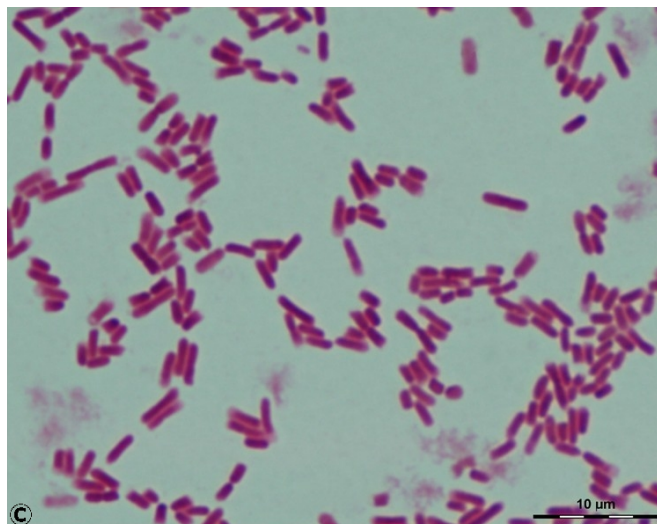
2.3. *Escherichia coli* išskyrimas

Surinkti mėginiai buvo sėjami į triptono sojos sultinį (ang., „Tryptone Soya Broth”, Oxoid, Anglija) ir kultivuojami 37 °C temperatūroje, 18-24 val, aerobinėmis sąlygomis.

Po kultivavimo triptono sojos sultinyje, *E. coli* padermių išskyrimui iš tiriamų mėginių naudotos diferencinės-diagnostinės terpės – Drigalskio laktozės (Oxoid, Anglija) ir Levino (Oxoid, Anglija) agarai. Mėginiai pasėti į vienkartinės Petri lėkšteles su minėtais agarais, buvo kultivuojami termostate esant 37 °C temperatūrai 18-24 val. Po kultivavimo vertintos išaugusių kolonijų kultūrinės savybės ir laktozės skaidymas.

Iš užaugusių mikroorganizmų kultūrų buvo paruošti tepinėliai jų morfologijai nustatyti. Tepinėliai dažyti Gramo (Diagnostica Merck, Vokietija) metodu ir stebėti mikroskopu. Gramo metodas – tai bakterijų dažymo metodas pagal kurį diferencijuojamos gramteigiamos ir gramneigiamos bakterijos. Gramteigiamos bakterijos nuo gramneigiamų atskiriamos pagal spalvą, kuria jos nusidažė - gramneigiamos dažosi raudonai, o gramteigiamos – mėlynai (3 pav.). Skirtingą dažymosi būdą lemia bakterijų sienelės struktūra. Gramteigiamų bakterijų sienelėje peptidoglikano sluoksnis sudaro apie 80,0 proc. visos bakterijos sienelės, kai tuo tarpu gramneigiamų tik apie 20,0 proc. Dažymo pradžioje naudojamas dažas kristalo violetas ir jodas, susidaro netirpūs kristalo

violeto – jodo kompleksai, kurie dėl storesnio peptidoglikano sluoksnio neišsiplauna iš gramteigiamų bakterijų užpylus ant mėginio organinio tirpiklio etanolio. Gramneigiamų bakterijų atveju, dėl plonesnio peptidoglikanų sluoksnio sienelėje, kompleksas yra išplaunamas. Todėl dažymo procese naudojamas antras dažas – bazinis fuksinas, kuris nudažo gramneigiamas bakterijas rožine spalva.



3 pav. *E. coli* mikroskopinis vaizdas (37)

Grynai *E. coli* kultūrai išskirti buvo atrinktos penkios mikroorganizmų kolonijos išaugusios ant diferencinių – diagnostinių terpių ir dar kartą persėtos ant Drigalskio latozės agaro. Užsėtos Petri lėkštelės kultivuotos termostate 37 °C temperatūroje 18-24 val. Išgavus gryną *E. coli* kultūrą, ją persėjome ant Luria Bertiani (LB) agaro (Becton, Dickinson, JAV) ir kultivavome 37 °C temperatūroje 18-24 val.

2.4. *Escherichia coli* identifikavimas. Biocheminių savybių nustatymas

Mėginiuose tirtos biocheminės savybės: indolo gamyba, sieros vandenilio (H₂S) išskyrimas, šlapalo hidrolizė, angliavandenių (maltozės, sacharozės, manitolio) skaidymas. *E. coli* būdinga indolo gamyba, manitolio ir sacharozės skaidymas, tačiau šios bakterijos neišskiria H₂S dujų, neskaido maltozės ir šlapalo.

2.4.1. Indolo nustatymas

Indolas yra nuodingas junginys, kuris susidaro mikroorganizmams skaidant triptofaną storosiose žarnose virškinimo metu. Indolą nustatinėjome su Erlichio reagentu, išmirkę jame filtrinį popierėlį. Popierėlį išdžiovinome ore ir įleidome į mėgintuvėlį su tirama kultūra taip, kad nesiliestų

prie mitybinės terpės. Jeigu mikroorganizmai gamina indolą, popierėlis nusidažo tamsiai raudona arba mėlyna spalva, jei ne – lieka geltonas.

2.4.2. Sieros vandenilio nustatymas

Anaerobinio kvėpavimo metu susidaro H_2S dujos. Šias dujas nustatinėjome skystoje terpėje su pasėta kultūra. Filtrinį popierėlį išmirkėme 10,0 proc. švino acetate ir įleidome į mėgintuvėlį taip, kad nesiliestų prie mitybinės terpės. Jei mikroorganizmai išskiria sieros vandenilį, popierėlis pajuoduoja.

2.4.3. Šlapalo hidrolizė. Amoniakos nustatymas

Šlapalo hidrolizės metu šlapalas skyla į amoniaką ir anglies dioksidą. Norėdami nustatyti ar mūsų tiriama kultūra vykdo šlapalo hidrolizę, į mėgintuvėlį su kultūra įleidome lakmuso popierėlį. Jei susidaro amoniakas, popierėlis pamėlynuoja.

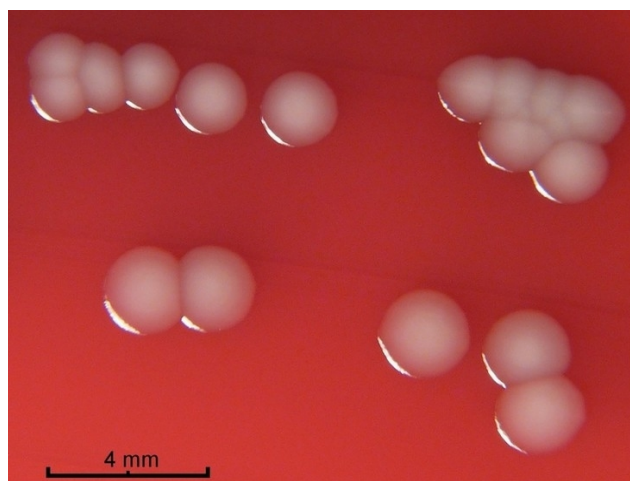
2.4.4. Angliavandenių skaidymas. Fermentinis aktyvumas.

Tyrimui naudojome diferencines-diaagnostines terpes, turinčias indikatorių ir angliavandenių bei trumpąją ir ilgąją margasias eiles. Trumpajai eilei priklauso gliukozė, laktozė, sacharozė, maltozė ir manitas, o ilgajai papildomai – arabinozė, ksilozė, ramnozė, galaktozė, inulinas, glikogenas, glicerinas ir dulcitas.

Išskyrėme gryną kultūrą ir užsėjome į margąją eilę. Kultivavome $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 18-24 val. Jei mikroorganizmai skaido angliavandenius, Ulenguto plūdėje susidaro dujos ir matosi spalvos pasikeitimas, o jei neskaido – spalvos pasikeitimo nėra.

2.4.5. Hemolizinių savybių nustatymas

Hemolizinėms *E. coli* padermėms identifikuoti, išskirti mikroorganizmai sėti ant specialiosios terpės – kraujo agarų. Tam tikros *E. coli* padermės išskiria hemolizinus ir hemolizuoja eritrocitus. *E. coli* kolonijos identifikuojamos pagal susidariusias hemolizines zonas (4 pav.).



4 pav. *E. coli* hemolizinės zonos (38)

2.4.6. Fermento beta laktamazės nustatymas

„Beta-laktamazės” testas (Beta-Lactamase Identification Sticks, Liofilchem, Italija) naudotas fermentą beta laktamazę sintetinančioms *E. coli* padermėms nustatyti. *E. coli* kolonijos bakteriologine kilpele buvo užneštos ant latekso popierėlio ir po 5-10 min. užlašinti 2 lašai beta laktamazės reagento. Jei ant indikatorinio popierėlio, aplink užneštą kultūrą, atsirado raudona spalva su melsvu žiedu, reakcija buvo laikoma teigiama. Tai reiškia, kad tiriamas mikroorganizmų padermė produkuoja fermentą beta laktamazę.

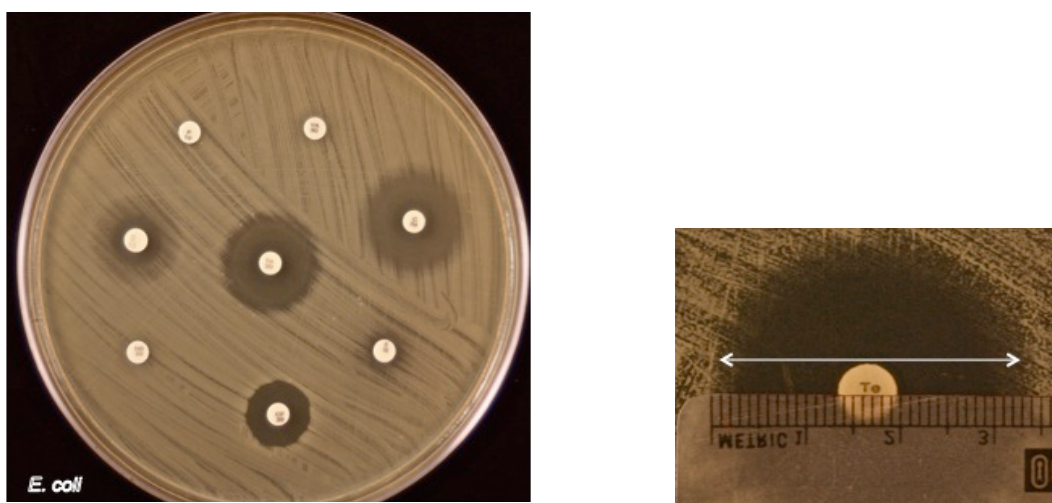
2.5. Mikroorganizmų atsparumo antimikrobinėms medžiagoms nustatymas

Bakterijų atsparumą antimikrobinėms medžiagoms nustatėme pagal modifikuotą Kirby-Bauer, diskų difuzijos metodą (Bauer ir kt, 1966) remiantis Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)) protokolu.

Penkias *E. coli* kolonijas išaugusias ant LB agaro perkėlėme į mėgintuvėlį su steriliu fiziologiniu tirpalu (angl. „Sodium Chloride”, Liofilchem, Italy). Paruošėme 0,5 McFarlando vienetų optinio tankumo bakterijų suspensiją. McFarland vienetais mikroorganizmų kiekį įvertinome McFarland Densitometer 1 („Biosan”, Olandija) aparatu. Sterilų vatos tamponą merkėme į gautą suspensiją, o skysčio perteklių pašalinome prispaudus jį prie mėgintuvėlio sienelės ir pasukus kelis kartus. Drėgnu tamponu užsėjome Miulero-Hintono (Oxoid, Anglija) terpę braukdami per sterilaus agaro paviršių. Šią procedūrą kartojome dar du kartus, kiekvieną kartą lėkštelę pasukant maždaug 60⁰ kampą, užtikrinant tolygų suspensijos pasiskirstymą.

Lėkštelę uždengėme ir trumpai palaikėme, kad nudžiūtų agaro paviršius. Ant agaro paviršiaus dėjome antimikrobinę medžiagų diskus. Lėkštelės buvo kultivuojamos termostate 35-37 °C temperatūroje 18-24 val. Atsparumą antimikrobinėms medžiagoms vertinome pagal galiojančius

standartus – bakterijų augimo inhibicijos zonas (5 pav.). Slopinamosios zonos skersmenį, kuriose buvo slopinamas mikroorganizmų augimas, matavome milimetrais. Zonas, pagal lentelėje (1 lentelė) pateiktus duomenis, įvertinome kaip jautrias, vidutiniškai jautrias ir atsparias.



5 pav. *E.coli* atsparumo antimikrobinėms medžiagoms nustatymas Kirby-Bauer diskų metodu (39)

1 lentelė. Antimikrobinių medžiagų veikliosios zonos išmatavimai (mm)

Veiklioji medžiaga	Jautru	Vidutiniškai jautru	Atsparu
Trimetoprimas (sulfonamidai) 2.5 µg	≥17	13-16	12≤
Streptomicinas 10 µg	≥15	12-14	11≤
Cefovecinas 2 µg	≥18	15-17	14≤
Amoksicilinas su klavulano rūgštimi 30 µg	≥15	12-14	11≤
Gentamicinas 10 µg	≥18	15-17	14≤
Enrofloksacinas 10 µg	≥17	13-16	12≤
Cefaleksinas 10µg	≥18	15-17	14≤
Florfenikolis 30 µg	≥18	13-17	12≤
Tetraciklinas 30 µg	≥19	15-18	14≤
Ampicilinas 10 µg	≥17	14-16	13≤
Penicilinas G 6 µg	≥17	14-16	13≤

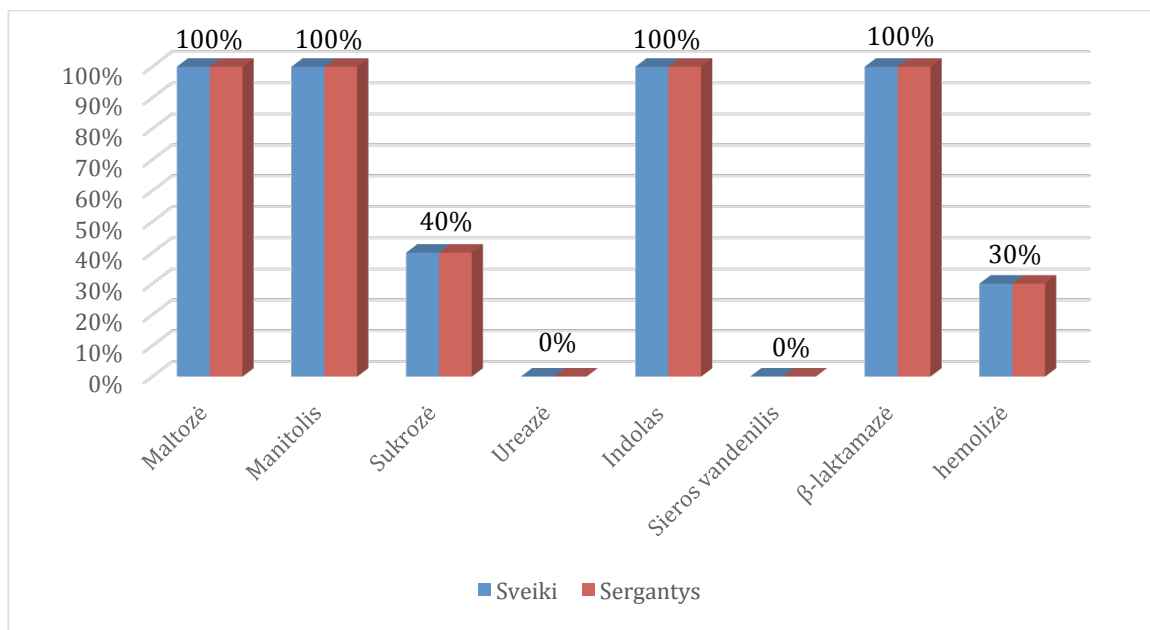
2.6. Statistinė duomenų analizė

Tyrimo analizė atlikta naudojant „Microsoft Excel'2007“ skaičiuoklę bei statistinių duomenų programą Sigma Plot. *E. coli* atsparumas antimikrobinėms medžiagoms išreikštas procentais. Skirtumai tarp vidurkių laikomi statistiškai patikimais jei reikšmė $p < 0,05$.

3. TYRIMŲ REZULTATAI

3.1. *Escherichia coli* išskyrimas iš šunų tiesiosios žarnos

Kultyvavus Petri lėšteles su Drigalskio laktozės agaru 24 val 37 °C temperatūroje, visuose 20 mėginių, išaugusios bakterijos keitė žalią terpės spalvą į geltoną. Tai požymis pagal kurį nustatėme, kad išskyrėme gryną *E. coli* visuose tirtuose mėginiuose. Rezultatų patikslinimui atlikome išaugintų bakterijų biocheminių savybių tyrimą. Tyrimų rezultatai parodyti 6 paveiksle.



6 pav. *E. coli* biocheminės savybės, proc.

3.2. *Escherichia coli* atsparumo antimikrobinėms medžiagoms nustatymas

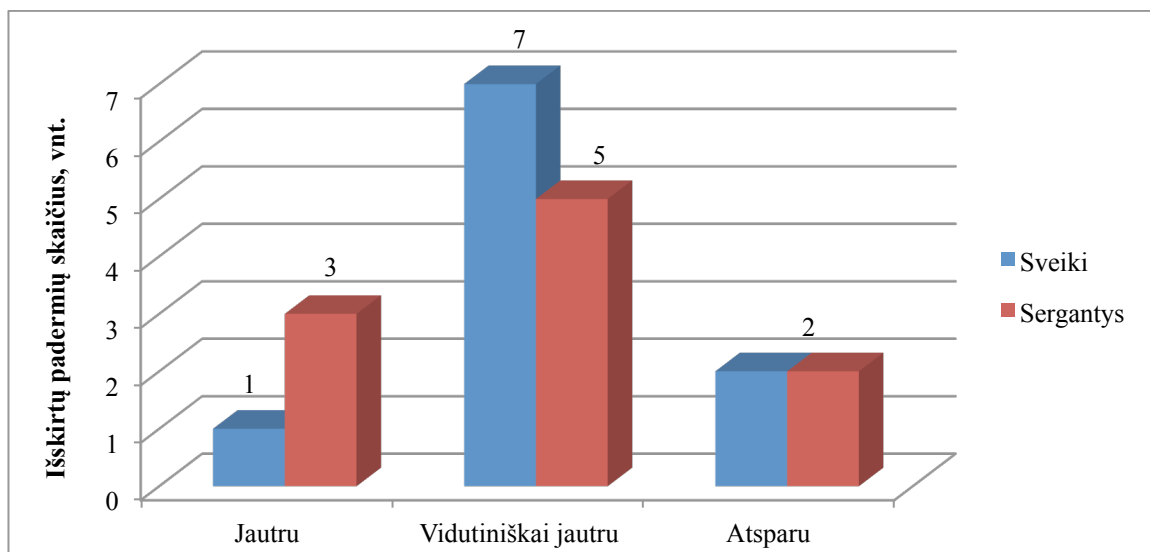
3.2.1. Streptomicino poveikis *Escherichia coli* kontrolinėje ir sergančių grupėse

Šunų išmatų mėginiuose, paimtuose iš tiesiosios žarnos, buvo įvertintas *E. coli* atsparumas streptomicinui (7 pav.). Rezultatai parodė, kad didžioji sveikų šunų dalis (70 proc.), turėjo vidutiniškai jautrias šiam antibiotikui *E. coli* padermes. Iš 10 proc. sveikų šunų išskirtos *E. coli* buvo jautrios streptomicinui, o likusius 20 proc., šioje grupėje, sudarė individai, iš kurių išskirtos bakterijos buvo visiškai atsparios šiai veikliajai medžiagai.

Sergančių grupėje, didžioji dalis šunų (50 proc.) turėjo vidutiniškai jautrias streptomocinui *E. coli*. 30 proc. šunų turėjo jautrias ir 20 proc. atsparias šiam antibiotikui bakterijas.

Lyginant sveikų ir sergančių šunų grupes matyti, kad sergančių šunų, kurie turėjo jautrias streptomicinui *E. coli* padermes, buvo 20 proc. daugiau nei sveikų šunų. Sveikų šunų, turinčių vidutiniškai jautrių šiai veikliajai medžiagai *E. coli* padermių, buvo 20 proc. daugiau nei sergančių.

Šunų, iš kurių išskyrėme atsparias streptomicinui *E. coli*, skaičius abeiose grupėse buvo vienodas. Lyginant šias dvi grupes nustatyta, kad gauti rezultatai yra statistiškai nepatikimi ($P > 0,05$).



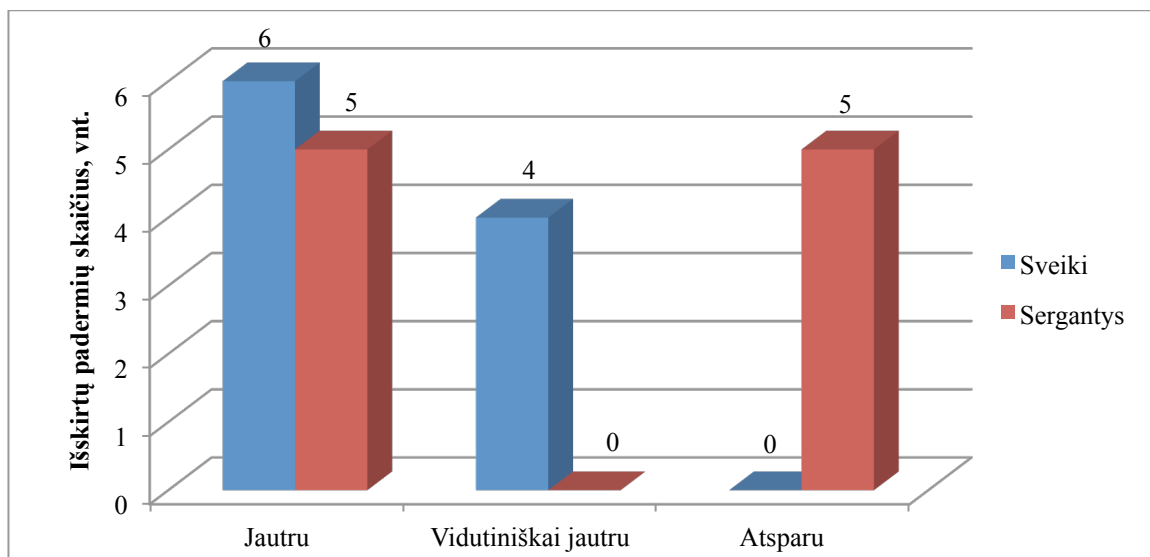
7 pav. *E. coli* atsparumas streptomicinui sveikų ($n=10$) ir sergančių ($n=10$) šunų išmatose.

3.2.2. Cefaleksino poveikis *Escherichia coli* kontrolinėje ir sergančių grupėse

E. coli atsparumą vertinome ir cefaleksinui (8 pav.) Šio tyrimo rezultatai parodė, kad daugiau nei pusė (60 proc.) sveikų šunų turėjo jautrias ir 40 proc. vidutiniškai jautrias cefaleksinui *E. coli* padermes. Atsparių cefaleksinui *E. coli* šioje grupėje neaptikome.

Sergančių šunų grupėje, pusė tiriamųjų turėjo jautrias *E. coli* padermes. Likusi dalis šunų turėjo *E. coli*, kurios buvo atsparios cefaleksino poveikiui. Vidutiniškai jautrių cefaleksino poveikiui *E. coli* padermių šioje grupėje neaptikta.

Lyginant sveikų ir sergančių šunų grupes matome, kad sveikų šunų, kurie turėjo *E. coli* padermių jautrių cefaleksinui buvo 10 proc., o vidutiniškai jautrių 40 proc. daugiau nei sergančių šunų. Sergančių šunų, turinčių atsparių šiam antibiotikui *E. coli* padermių, buvo 50 proc. daugiau nei sveikų šunų. Lyginant šias dvi grupes nustatyta, kad rezultatai yra statistiškai patikimi ($P = 0,011$).



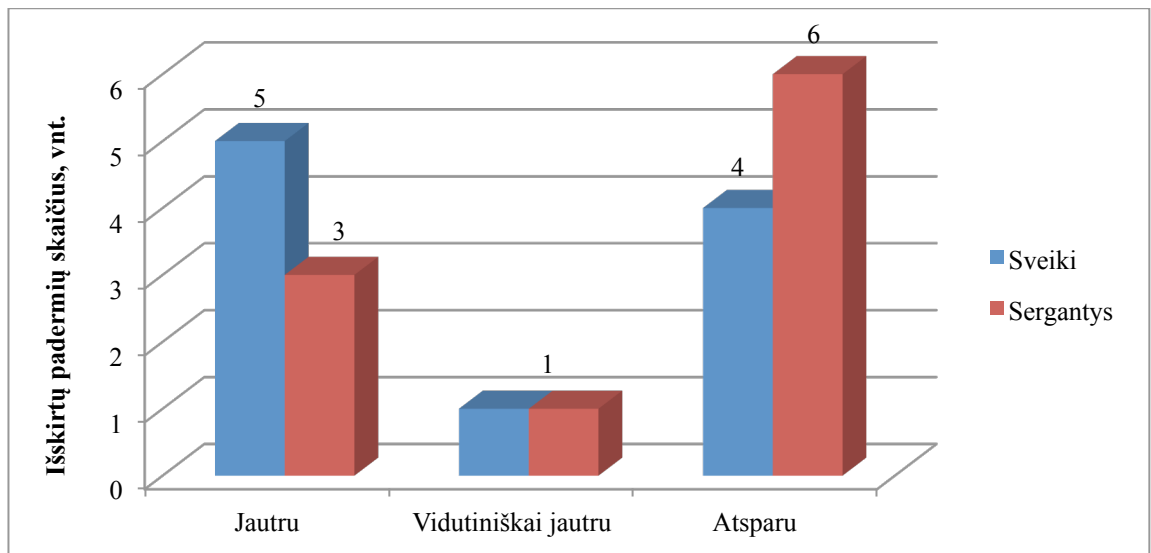
8 pav. *E. coli* atsparumas cefaleksinui sveikų (n=10) ir sergančių (n=10) šunų išmatose.

3.2.3. Ampicilino poveikis *Escherichia coli* kontrolinėje ir sergančių grupėse

Tiriant atsparumą ampicilinui (9 pav.) nustatyta, kad iš pusės (50 proc.) sveikų šunų išskirtos *E. coli*, buvo jautrios šiam antibiotikui. Likusi pusė šunų turėjo vidutiniškai jautrių (10 proc. šunų) ir atsparių (40 proc. šunų) ampicilinui *E. coli* padermių.

Sergančių šunų grupėje, 30 proc. šunų turėjo jautrias ampicilinui *E. coli* padermes, 10 proc. vidutiniškai jautrias, o didžiausią procentą (60 proc.) sudarė šunys, iš kurių buvo išskirtos atsparios šiam antibiotikui *E. coli* padermės.

Palyginus sveikų ir sergančių šunų grupes matyti, kad sveikų šunų, kurie turėjo jautrias ampicilinui *E. coli* padermes, yra 20 proc. daugiau nei sergančių. Sveikų ir sergančių šunų, kuriuose aptikome vidutiniškai jautrias šiam antibiotikui *E. coli* padermes, skaičius yra vienodas. Sergančių šunų, kurie turėjo atsparias ampicilinui *E. coli* padermes, buvo 20 proc. daugiau nei sveikų šunų. Palyginus šias dvi grupes nustatyta, kad gauti rezultatai yra statistiškai nepatikimi ($P > 0,05$).



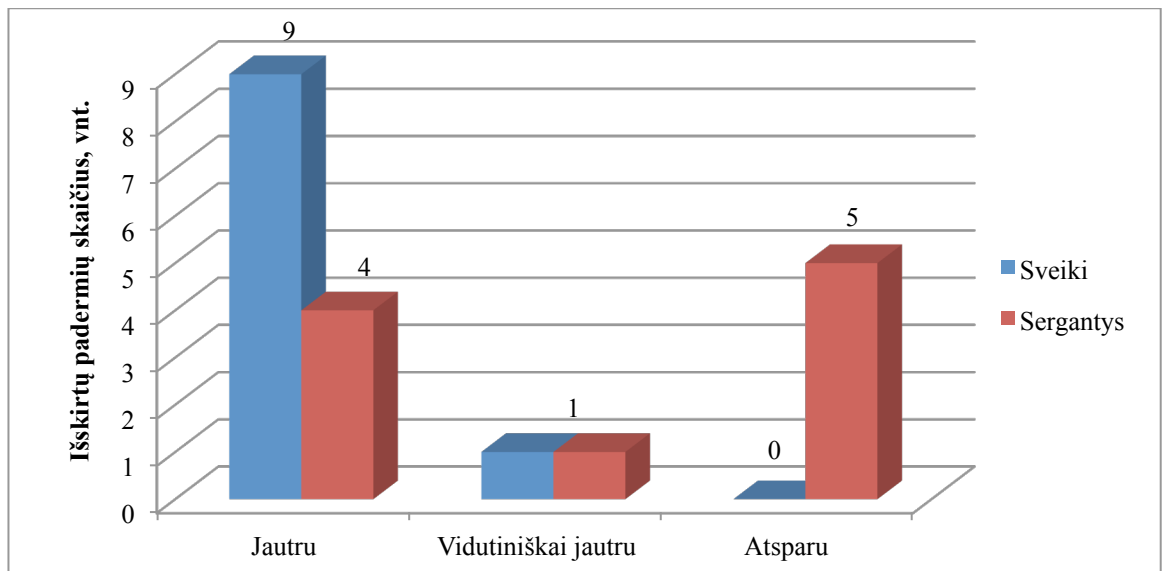
9 pav. *E. coli* atsparumas ampicilinui sveikų (n=10) ir sergančių (n=10) šunų išmatose.

3.2.4. Amoksicilino su klavulano rūgštimi poveikis *Escherichia coli* kontrolinėje ir sergančių grupėse

Atlikus *E. coli* atsparumo amoksicilinui su klavulano rūgštim nustatymą (10 pav.), rezultatai parodė, kad didžioji dalis (90 proc.) šunų turėjo jautrias ir 10 proc. vidutiniškai jautrias, amoksicilinui su klavulano rūgštim, *E. coli* padermes. Atsparių šiam antibiotikui *E. coli* padermių šioje grupėje neradome.

Didesnę dalį (50 proc.), sergančių tarpė, sudarė šunys, iš kurių buvo išskirtos atsparios amoksicilinui su klavulano rūgštim *E. coli* padermės. 40 proc. šunų turėjo jautrias ir 10 proc. vidutiniškai jautrias šiam antibiotikui *E. coli* padermes.

Palyginus sveikų ir sergančių šunų grupes nustatėme, kad sveikų šunų, kurie turėjo amoksicilinui su klavulano rūgštim jautrias *E. coli*, buvo 50 proc. daugiau nei sergančių šunų. Vidutiniškai jautrių šiam antibiotikui *E. coli*, abejose grupėse buvo vienodai, o atsparių *E. coli* padermių, buvo rasta tik pas sergančius šunis. Palyginus sveikų ir sergančių šunų grupes nustatyta, kad gauti rezultatai yra statistiškai patikimi ($P = 0,031$).



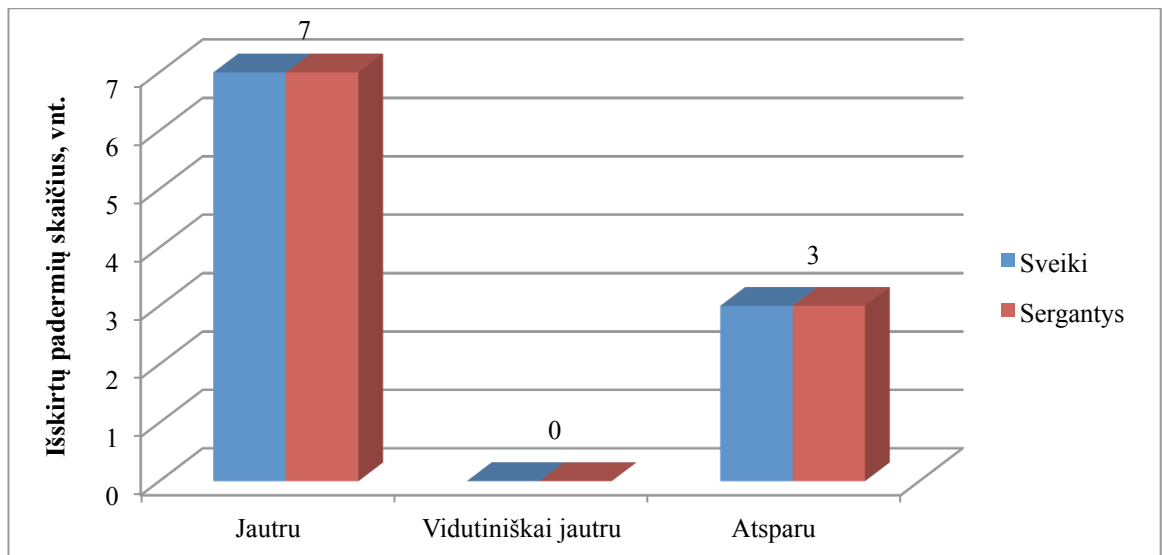
10 pav. *E. coli* atsparumas amoksicilinui su klavulano rūgštimi sveikų (n=10) ir sergančių (n=10) šunų išmatose.

3.2.5. Cefovecino poveikis *Escherichia coli* kontrolinėje ir sergančių grupėse

Tyrimuose su cefovecinu (11 pav.) nustatėme, kad sveikų šunų tarpe, didesnę dalį (70 proc.) sudarė šunys, turintys jautrias šiam antibiotikui *E. coli* padermes. Likusius 30 proc. sudarė šunys, iš kurių buvo išskirtos atsparios šiai antimikrobinei medžiagai *E. coli* padermės. Vidutiškai jautrių cefovecinui *E. coli* padermių, šioje grupėje aptikta nebuvo.

Sergančių šunų grupėje, didesnę dalį (70 proc.), sudarė šunys, iš kurių buvo išskirtos jautrios cefovecinui *E. coli* padermės. Likusius 30 proc. sudarė šunys, turintys atsparias šiai antimikrobinei medžiagai *E. coli*. Šunų, turinčių vidutiniškai jautrių cefovecinui *E. coli* padermių, šioje grupėje nebuvo.

Lyginant abejas grupes matyti, kad tiek sveiki tiek sergantys šunys, turėjo 70 proc. jautrių ir 30 proc. atsparių *E. coli* padermių. Lyginant sveikų ir sergančių šunų grupes nustatėme, kad rezultatai yra statistiškai nepatikimi ($P > 0,05$).



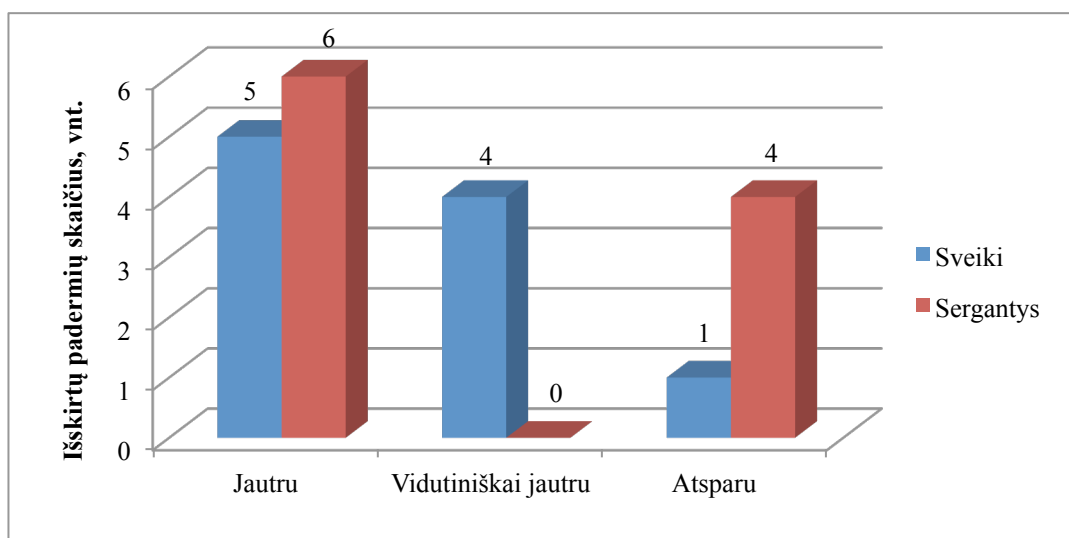
11 pav. *E. coli* atsparumas cefovecinui sveikų (n=10) ir sergančių (n=10) šunų išmatose.

3.2.6. Tetraciklino poveikis *Escherichia coli* kontrolinėje ir sergančių grupėse

Ištyrus tetraciklino poveikį išskirtoms *E. coli* padermėms (12 pav.) sveikų šunų grupėje nustatėme, kad 50 proc. šunų turėjo jautrias, 40 proc. vidutiniškai jautrias ir 10 proc. atsparias *E. coli* padermes.

Sergančių šunų grupėje, daugiau nei pusė (60 proc.) individų turėjo jautrias ir 40 proc. atsparias *E. coli* padermes. Vidutiniškai jautrių ešerichijų šioje grupėje nebuvo.

Lyginant sveikų ir sergančių šunų grupes matyti, kad sveikų šunų, kurie turėjo jautrias tetraciklinui *E. coli* padermes, buvo 10 proc. mažiau nei sergančių šunų. Vidutiniškai jautrių *E. coli* turėjo tik sveiki šunys. Daugiau (30 proc.) atsparių bakterijų išskirta iš sergančių šunų. Lyginant šias dvi grupes nustatyta, kad gauti rezultatai yra statistiškai patikimi ($P = 0,49$).



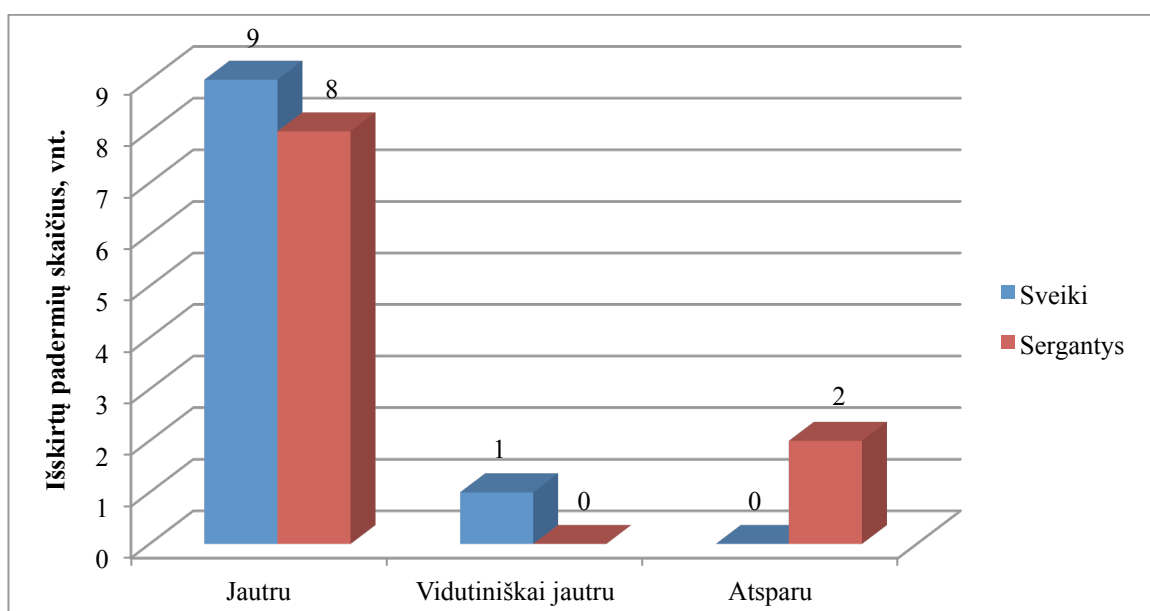
12 pav. *E. coli* atsparumas tetraciklinui sveikų (n=10) ir sergančių (n=10) šunų išmatose.

3.2.7. Sulfonamidų poveikis *Escherichia coli* kontrolinėje ir sergančių grupėse

Šunų išmatų mėginiuose, buvo įvertintas *E. coli* atsparumas sulfonamidams (13 pav.). Rezultatai parodė, kad didžioji sveikų šunų dalis (90 proc.), turėjo jautrias šiam antibiotikui *E. coli* padermes. Iš 10 proc. sveikų šunų išskirtos *E. coli* buvo vidutiniškai jautrios sulfonamidams, o atsparių šiai antimikrobinei medžiagai *E. coli*, šioje grupėje neaptikome.

Sergančių grupėje, didžioji dalis šunų (80 proc.) turėjo jautrias ir 20 proc. atsparias sulfonamidams *E. coli*. Vidutiniškai atsparių ešerichijų šioje grupėje neradome.

Lyginant sveikų ir sergančių šunų grupes matyti, kad sveikų šunų, kurie turėjo jautrias sulfonamidams *E. coli* padermes, buvo 10 proc. daugiau nei sergančių šunų. Vidutiniškai jautrių *E. coli* buvo tik pas sveikus, o atsparių tik pas sergančius šunis. Palyginus sveikų ir sergančių šunų grupes nustatyta, kad gauti rezultatai yra statistiškai nepatikimi ($P > 0,05$).



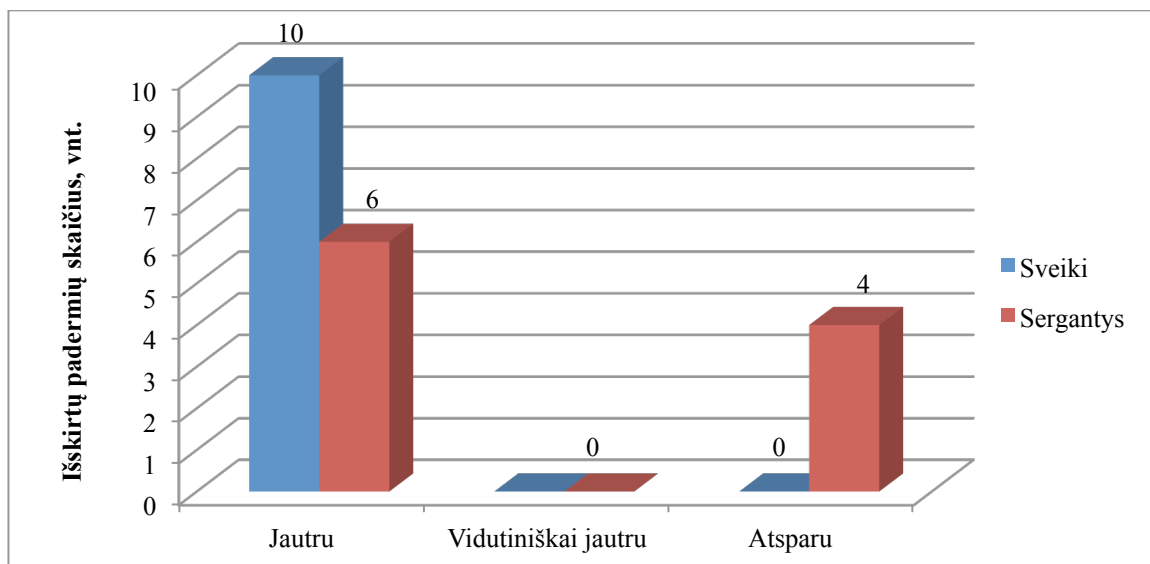
13 pav. *E. coli* atsparumas sulfonamidams sveikų (n=10) ir sergančių (n=10) šunų išmatose.

3.2.8. Enrofloksacino poveikis *Escherichia coli* kontrolinėje ir sergančių grupėse

Tyrimuose su enrofloksacinu (14 pav.) nustatėme, kad sveikų šunų grupėje, iš visų šunų buvo išskirtos jautrios šiam antibiotikui *E. coli* padermės. Nei atsparių, nei vidutiniškai jautrių ešerichijų šioje grupėje neišskyrėme.

Sergančių šunų grupėje, didesnę dalį (60 proc.), sudarė šunys, iš kurių buvo išskirtos jautrios enrofloksacinui *E. coli* padermės. Likusius 40 proc. sudarė šunys, turintys atsparias šiai antimikrobinei medžiagai *E. coli*. Šunų, turinčių vidutiniškai jautrių enrofloksacinui *E. coli* padermių, šioje grupėje nebuvo.

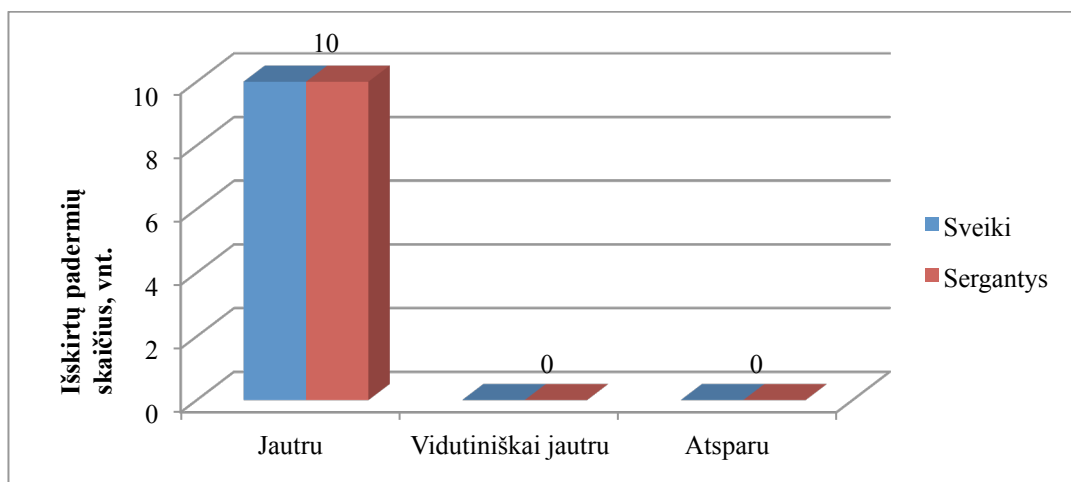
Lyginant abejas grupes matyti, kad sveikų šunų, iš kurių buvo išskirtos jautrios enrofloksacinui *E. coli* padermės, buvo 40 proc. daugiau nei sergančių šunų. Atsparių *E. coli*, sergantys šunys turėjo 40 proc. daugiau. Palyginus šias dvi grupes nustatyta, kad gauti rezultatai yra statistiškai nepatikimi ($P > 0,05$).



14 pav. *E. coli* atsparumas enrofloksacinui sveikų ($n=10$) ir sergančių ($n=10$) šunų išmatose.

3.2.9. Florfenikolio poveikis *Escherichia coli* kontrolinėje ir sergančių grupėse

Atlikus *E. coli* atsparumo florfenikoliui tyrimą (15 pav.) nustatėme, kad iš sveikų ir sergančių šunų išskirtos *E. coli* padermės buvo 100 proc. jautrios florfenikoliui. Vidutiniškai jautrių ir atsparių *E. coli* aptikta nebuvo. Lyginant sveikų ir sergančių šunų grupes nustatyta, kad gauti rezultatai yra statistiškai nepatikimi ($P > 0,05$).



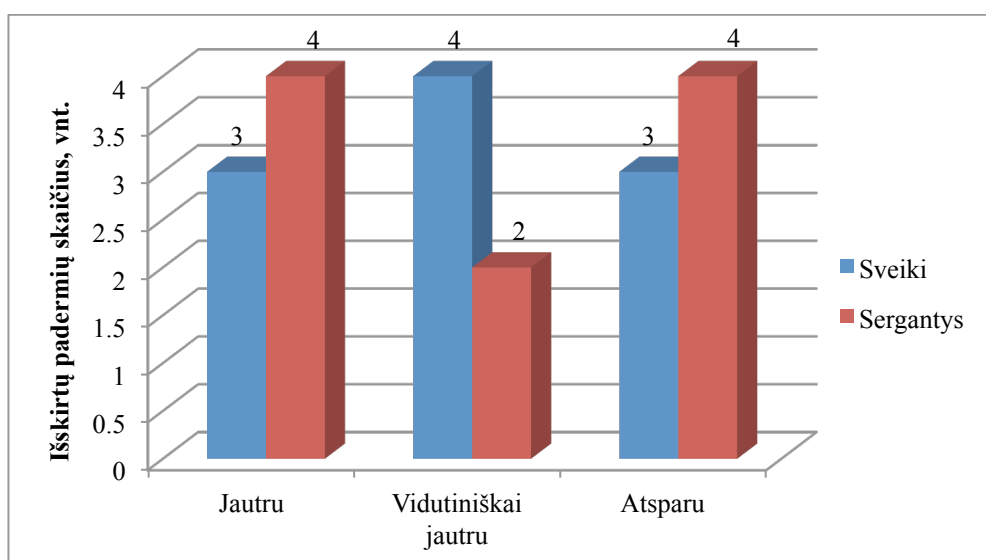
15 pav. *E. coli* atsparumas florfenikoliui sveikų ($n=10$) ir sergančių ($n=10$) šunų išmatose

3.2.10. Gentamicino poveikis *Escherichia coli* kontrolinėje ir sergančių grupėse

Tiriant atsparumą gentamicinui (16 pav.) nustatyta, kad didesnė dalis (40 proc.) sveikų šunų turėjo vidutiniškai jautrias, 30 proc. jautrias ir 30 proc. atsparias šiam antibiotikui *E. coli* padermes.

Sergančių šunų grupėje, 40 proc. šunų turėjo jautrias gentamicinui *E. coli* padermes, 20 proc. vidutiniškai jautrias, o 40 proc. sudarė šunys, iš kurių buvo išskirtos atsparios šiam antibiotikui *E. coli* padermės.

Palyginus sveikų ir sergančių šunų grupes matyti, kad sergančių šunų, kurie turėjo jautrias gentamicinui *E. coli*, yra 10 proc. daugiau nei sergančių. Sveikų šunų, kurie turėjo vidutiniškai jautrias *E. coli*, buvo 20 proc. daugiau nei sergančių. Sergančių šunų, iš kurių išskyrėme atsparias gentamicinui *E. coli* padermes, buvo 10 proc. daugiau nei sveikų šunų. Palyginus sveikų ir sergančių šunų grupes nustatyta, kad rezultatai yra statistiškai nepatikimi ($P > 0,05$).



16 pav. *E. coli* atsparumas gentamicinui sveikų ($n=10$) ir sergančių ($n=10$) šunų išmatose.

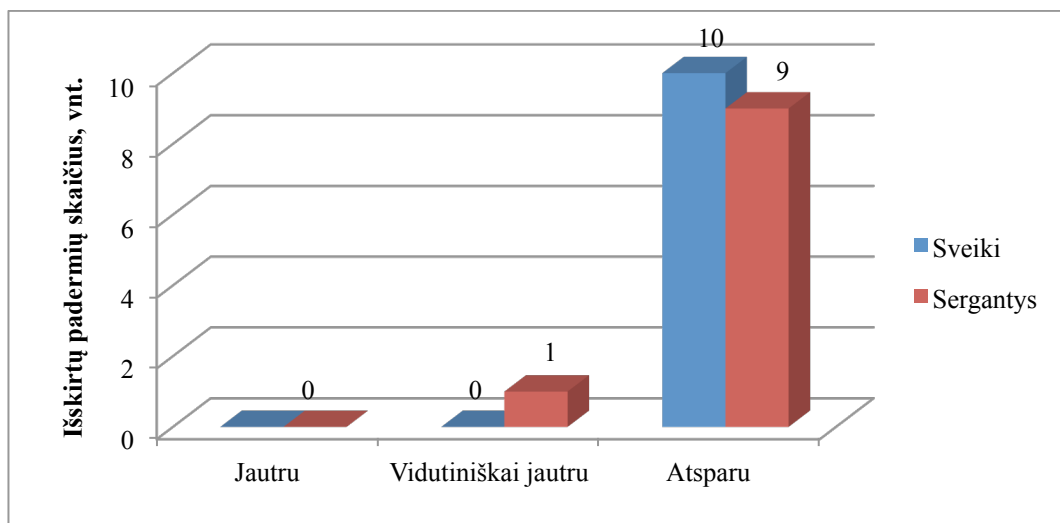
3.2.11. Benzilpenicilino poveikis *Escherichia coli* kontrolinėje ir sergančių grupėse

Šunų išmatų mėginiuose, paimtuose iš tiesiosios žarnos, buvo įvertintas *E. coli* atsparumas benzilpenicilinui (17 pav.). Rezultatai parodė, kad sveikų šunų grupėje, visos išskirtos *E. coli* padermės, buvo atsparios benzilpenicilinui. Jautrių ir vidutiniškai jautrių ešerichijų šioje grupėje neišskyrėme.

Didžioji sergančių šunų dalis (90 proc.), turėjo atsparias šiam antibiotikui *E. coli* padermes. Iš 10 proc. sergančių šunų išskirtos *E. coli*, buvo vidutiniškai jautrios benzilpenicilinui. Jautrių *E. coli* sergančių šunų grupėje neišskyrėme.

Lyginant sveikų ir sergančių šunų grupes matyti, kad sergančių šunų, kurie turėjo vidutiniškai jautrias benzilpenicilinui *E. coli* padermes, buvo 10 proc. daugiau nei sveikų šunų. Sveikų šunų,

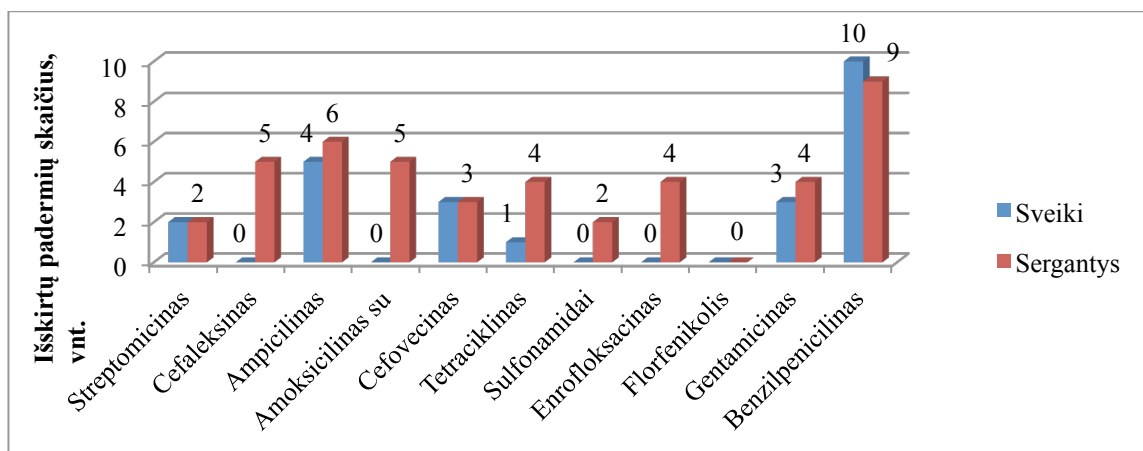
turinčių jautrių šiai veikliajai medžiagai *E. coli*, buvo 10 proc. daugiau nei sergančių. Palyginus šias dvi grupes nustatyta, kad rezultatai yra statistiškai nepatikimi ($P > 0,05$).



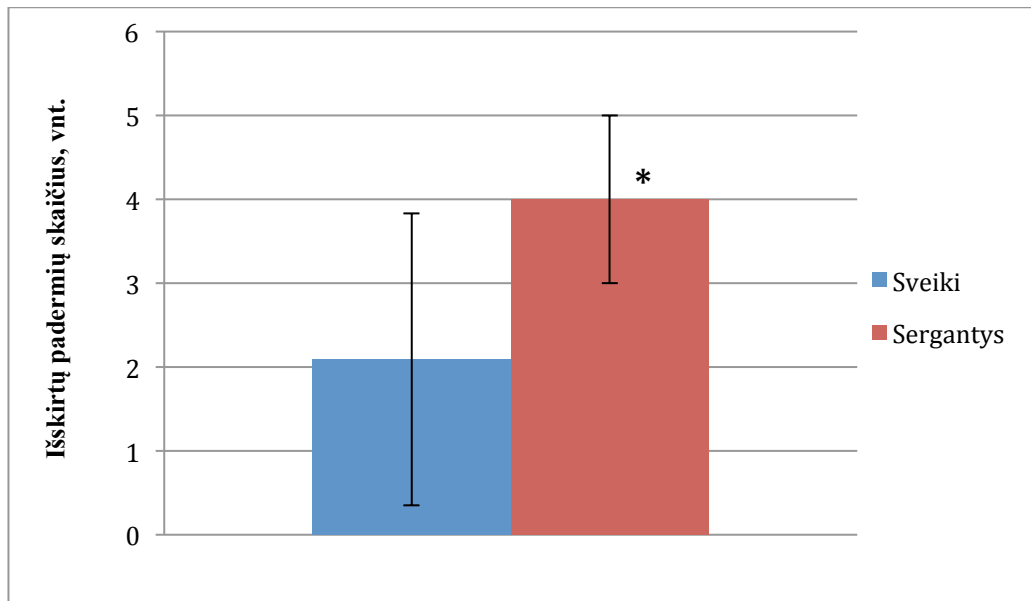
17 pav. *E. coli* atsparumas benzilpenicilinui sveikų (n=10) ir sergančių (n=10) šunų išmatose.

3.2.12. Bendras *Escherichia coli* atsparumas veikliosioms medžiagoms kontrolinėje ir sergančių grupėse

Atlikus visų gautų duomenų analizę nustatėme, kad daugumai naudotų veikliųjų medžiagų (90.91 proc. visų medžiagų) *E. coli* buvo atsparesnės arba vienodai atsparios sergančių šunų grupėje, lyginant su sveikų šunų grupe. Tuo tarpu sveikų šunų grupėje išskirtos *E. coli*, didesnę atsparumą turėjo tik benzilpenicilinui (18 pav.). Taip pat, lyginant sergančiųjų grupę su kontroline grupe, padaryta išvada, kad sergančiųjų grupėje *E. coli* statistiškai patikimai ($p = 0,014$) 2 kartus buvo atsparesnės naudotoms veikliosioms medžiagoms nei kontrolinėje grupėje (19 pav.).



18 pav. Bendras *E. coli* atsparumas veikliosioms medžiagoms sveikų (n=10) ir sergančių (n=10) šunų išmatose.



19 pav. *E. coli* atsparumo antimikrobinėms medžiagoms palyginimas sveikų (n=10) ir sergančių (n=10) šunų išmatose.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Atlikto tyrimo metu atsparias tetraciklinui *E. coli* padermes išskyrėme iš 10 proc. sveikų ir 40 proc. sergančių šunų.

Estijoje, Aasmæ ir kitų mokslininkų atlikto tyrimo metu (28), buvo tirtas 86 sveikų šunų atsparumas tetraciklinui. Nustatyta, kad iš 45,5 proc. tiriamųjų išskirtos *E. coli* buvo atsparios šiam antibiotikui. Panašų tyrimą Danijoje atliko Pedersan ir kiti (31), kurio metu mėginiai buvo imami iš sergančių šunų išmatų ir tiesiosios žarnos. Nustatyta, kad iš 11,6 proc. tiriamųjų išskirtos *E. coli* buvo atsparios tetraciklinui. Nam bei kiti mokslininkai, Korėjoje atliko dar vieną panašų tyrimą (36), kurio metu mėginiai buvo surinkti iš 877 šunų tiesiosios žarnos. Tiriamieji buvo išskirti į dvi grupes – vieną jų sudarė namuose laikyti šunys (566 šunų), kitą hospitalizuoti (312 šunų). Iš 52,4 proc. namuose laikytų ir 53,6 proc. hospitalizuotų šunų išskirtos *E. coli* buvo atsparios tetraciklinui. Cumming ir kitų mokslininkų, JAV atliktame tyrime (30) nustatyta, kad iš 23,6 proc. tyrime dalyvavusių šunų išskirtos *E. coli* buvo atsparios tetraciklinui. Mūsų tyrimo metu gauti rezultatai nesutampa su minėtų autorių tyrimų rezultatais.

Atlikę *E. coli* atsparumo ampicilinui nustatymą gavome tokius rezultatus: atsparios šiam antibiotikui *E. coli* padermės buvo rastos pas 40 proc. sveikų ir 60 proc. sergančių šunų.

Estijoje atliktame Aasmæ ir kitų tyrime (28), buvo nustatytas *E. coli* atsparumas ampicilinui. Rezultatai parodė, kad iš 21,5 proc. tiriamųjų išskirtos *E. coli* buvo atsparios šiai veikliajai medžiagai. Taip pat, *E. coli* atsparumą ampicilinui tyrė skandinavai, Harada bei kt. (29). Tyrimo metu mėginiai imti iš 43 sveikų šuniukų ir nustatyta, kad iš 60,5 proc. tiriamųjų išskirtos *E. coli* buvo atsparios šiai veikliajai medžiagai. Dar vienas tyrimas buvo atlikas JAV, Cummings ir kt. (30). Mėginiai tyrimui buvo imti iš 132 sergančių šunų išmatų arba žarnyno. Nustatyta, kad iš 43,1 proc. tiriamųjų išskirtos *E. coli* buvo atsparios ampicilinui.

Mūsų tyrimo rezultatai panašūs į JAV, Cumming ir kt. (30) atlikto tyrimo rezultatus, nes abejais atvejais, sergančiųjų šunų tarpe, *E. coli* atsparumas ampicilinui siekė apie 60 proc. Aasmæ ir kitų tyrime (28) bei Harada ir kt. (29) mokslininkų atliktuose tyrimuose, gauti rezultatai skyrėsi nuo mūsų tyrimo rezultatų.

Ištyrus *E. coli* atsparumą florfenikoliui nustatėme, kad tiek iš sveikų, tiek iš sergančių šunų išskirtos *E. coli* padermės buvo neatsparios šiam antibiotikui.

Pedersan ir kt. savo tyrime (31) taip pat nustatinėjo *E. coli* atsparumą florfenikoliui. Mėginius tyrimui mokslininkai surinko iš 449 šunų su klinikiniais požymiais išmatų, žarnyno ir viškinamojo trakto organų. Tyrimai parodė, kad iš 0,81 proc. tiriamųjų išskirtos *E. coli* buvo atsparios florfenikoliui.

Tyrimo, kurį atlikome, rezultatai nesutampa su minėto (31) tyrimo rezultatais, nes mūsų tirtos *E. coli* buvo 100 proc. jautrios florfenikoliui.

Mūsų atlikto tyrimo metu atsparias streptomycinui *E. coli* padermes išskyrėme iš 20 proc. sveikų ir sergančių šunų.

Pedersen ir kt. (31). nustatinėjo *E. coli* atsparumą ir streptomycinui. Buvo nustatyta, kad iš 22,3 proc. sergančių šunų išmatų, tiesiosios žarnos bei vidaus organų išskirtos *E. coli* padermės buvo atsparios streptomycinui. Korėjoje Nam ir kt. (36) ištyrė benamius ir laikomus namuose šunis, kurie turėjo klinikinių ligos požymių. Benamių šunų grupėje, kuriose buvo išskirta atspari streptomycinui *E. coli*, individų skaičius sudarė 35,8 proc. visų tiriamųjų. Laikomų namuose šunų grupėje, tokių *E. coli* rasta pas 41,7 proc. tiriamųjų.

Šio tyrimo rezultatai sutampa su Nam ir kitų mokslininkų (36) gautais tyrimų rezultatais, nes *E. coli* atsparumas streptomycinui sergančių šunų grupėje buvo 20 proc. Pedersen ir kt. (31) atlikto tyrimo rezultatai nesutapo su mūsų tyrimo rezultatais.

Ištyrę *E. coli* atsparumą amoksicilinui su klavulano rūgštim nustatėme, kad sveiki šunys neturėjo *E. coli* padermių atsparių šiam antibiotikui, tačiau sergančių šunų tarpe, tokių ešerichijų pasitaikė pas 50 proc. tiriamųjų.

Danijoje atlikto tyrimo metu (31) buvo ištirtas amoksicilino su klavulano rūgštimi atsparumas *E. coli* padermėms, išskirtoms iš sergančių šunų išmatų, žarnyno bei vidaus organų. Nustatyta, kad pas 3,8 proc. šunų *E. coli* buvo atsparios šiam antibiotikui. Jungtinėse Amerikos Valstijose Cornell'o Universiteto Gyvūnų ir Sveikatos centre Cummings ir kt. (30) nustatė, kad *E. coli* atsparumas amoksicilinui ir klavulano rūgščiai buvo 15,7 proc.

Mūsų tyrimo rezultatai nesutapo su minėtų autorių tyrimo rezultatais, nes gavome ženkliai didesnę *E. coli* atsparumą amoksicilinui su klavulano rūgštim, nei jie.

Atlikę *E. coli* atsparumo gentamicinui nustatymą gavome tokius rezultatus: atsparios šiam antibiotikui *E. coli* padermės buvo rastos pas 30 proc. sveikų ir 40 proc. sergančių šunų.

2008 metais atliktas tyrimas Danijoje (31), kurio metu buvo ištirti sergančių šunų išmatų, žarnyno bei virškinamojo trakto organų mėginiai. Nustatyta, kad pas 2,9 proc. tiriamųjų, *E. coli* buvo atsparios gentamicinui. JAV atlikto tyrimo metu (30), atsparių *E. coli* padermių aptikta pas 15,5 proc. tiriamųjų šunų. Nam ir kitų mokslininkų atlikto tyrimo metu (36), *E. coli* atsparumas gentamicinui, pasireiškė pas 16,1 proc. benamių šunų ir pas 21,8 proc. namuose laikomų šunų.

Mūsų atliktame tyrime *E. coli* atsparumas buvo didesnis ir nesutampa su kitų autorių tyrimų rezultatais.

Atlikę bandymus su enrofloksacinu, atsparių šiam antibiotikui *E. coli* padermių aptikome pas 40 proc. sergančių šunų. Sveikų šunų tarpe atsparių ešerichijų neradome.

Cummings ir kiti (30) atsparių enrofloksacinui *E. coli* padermių rado pas 18,1 proc. tiriamųjų. Mūsų tyrimo metu aptiktas ženkliai didesnis atsparumas šiam antibiotikui nei minėtų autorių tyrimo metu.

Atlikto tyrimo metu atsparias sulfonamidams *E. coli* padermes išskyrėme iš 20 proc. sergančių šunų. Sveikų šunų tarpe atsparių šiems antibiotikams *E. coli* neaptikome.

2008 metais atliktame tyrime (31) nustatyta, kad atsparių sulfonamidams *E. coli* padermių turėjo 26,7 proc. tirtų sergančių šunų.

Tyrimo rezultatai nesutampa, kadangi sergančiųjų šunų grupėje *E. coli* atsparumas sulfonamidų grupės antibiotikams buvo mažesnis nei Danijoje atlikto tyrimo metu (31).

Atsparumo nustatymą atlikome ir su cefovecinu. Rezultatai parodė, kad atsparios šiam antibiotikui *E. coli* padermės rastos pas 30 proc. sveikų ir 30 proc. sergančių šunų.

Lenkijoje atlikto tyrimo metu, Rzewuska bei kiti (27) nustatė, kad atsparios cefovecinui *E. coli* rastos pas 28,2 proc. sergančių šunų.

Šio tyrimo rezultatai panašūs į minėtų autorių rezultatus.

IŠVADOS

1. *Escherichia coli* išskyrėme iš visų tirtų išmatų mėginių, tiek sveikų tiek sergančių šunų grupėse.

2. Sveikų šunų grupėje *Escherichia coli* padermės buvo visiškai atsparios benzilpenicilinui, mažiau atsparios – streptomycinui, ampicilinui, cefovecinui, tetraciklinui ir gentamicinui, o jokio atsparumo neturėjo cefaleksinui, amoksicilinui su klavulano rūgštimi, sulfonamidams, enrofloksacinui ir florfenikoliui.

3. Sergančių šunų grupėje *Escherichia coli* padermės labiausiai atsparios buvo benzilpenicilinui, ampicilinui, cefaleksinui ir amoksicilinui su klavulano rūgštimi, mažiau atsparios – streptomycinui, cefovecinui, tetraciklinui, sulfonamidams, enrofloksacinui ir gentamicinui, o jokio atsparumo neturėjo tik florfenikoliui.

4. Sergančių šunų grupėje atsparių antimikrobinėms medžiagoms *Escherichia coli* padermių buvo du kartus daugiau nei sveikų šunų grupėje.

LITERATŪRA

1. Bornside GH, Cohn I. The Normal Microbial Flora. Comparative Bacterial Flora of Animals and Man. American Journal of Digestive Diseases, New Series. 1965;10(10):844-852.
2. Simpson JM, Martineau B, Jones WE, Ballam JM, Mackie RI. Characterization of Fecal Bacterial Populations in Canines: Effects of Age, Breed and Dietary Fiber. Microbial Ecology. 2002;44:186-197
3. Blattner FR, Plunket G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M et al. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. Science Magazine. 1997; 277:1453-1462
4. Manning SD. *Escherichia coli* infections. Second edition. New York: Infobase Publishing; 2010. p. 8-14, 44-62
5. Šiugždaitė J. Veterinarinės mikrobiologijos pagrindai. Mokomoji knyga. LSMU leidybos namai, Kaunas. 2012. P. 95-96
6. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. Philadelphia: Elsevier MOSBY; 2005. P. 12-18; 326-330
7. Švambarytė S. Atsparumą antibiotikams suteikiančių siurblių TetA ir AcrAB veiklos *Escherichia coli* ląstelėse tyrimas. Magistrinis darbas. Vilnius. 2007. 31 p.
8. *E. coli* sienelės struktūra. [žiūrėta 2016-01-07] prieiga per internetą:
<https://classconnection.s3.amazonaws.com/562/flashcards/2495562/jpg/gram_1356011509723.jp>
9. Donnenberg MS, editor. *Escherichia coli*. Pathotypes and Principles of Pathogenesis. 2nd edition. Oxford: Elsevier Inc.; 2013. p. 5
10. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D. Clinical Veterinary microbiology. Second Edition. Oxford: Elsevier Ltd; 2013. P. 245-246, 250, 255
11. Kohler CD, Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? Int J Med Microbiol. 2011;301(8):642-7
12. Beutin L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. Veterinary Research, BioMed Central. 1999;30(2-3):285-298
13. Adesiyun AA, Campbell M, Kaminjolo JS. Prevalence of bacterial enteropathogens in pet dogs in Trinidad. Zentralbl Veterinarmed B. 1997;44(1):19-27.
14. Hammermueller, Kruth S, Prescott J, Gyles C. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. Canadian journal of veterinary research. 1995; 59(4): 265–270

15. Cloete TE. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2003; 51(4):277-282.
16. Leekha S, Terrell CL, Edson RS. *General Principles of Antimicrobial Therapy*. *Mayo Clin Proc*. 2011; 86(2): 156–167
17. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2015.
18. van Duijn PJ, Dautzenberg MJ, Oostdijk EA. Recent trends in antibiotic resistance in European ICUs. *Curr Opin Crit Care*. 2011;17(6):658-65
19. Angulo FJ, Nunnery JA, Bair HD. Antimicrobial resistance in zoonotic enteric pathogens. *Rev Sci Tech*. 2004;23(2):485-96
20. van Hoek AHAM, Mevius, D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol*. 2011; 2: 203
21. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(10):1451-70.
22. Bush K, Jacoby JA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. 2010;54:969-976
23. Bush K. Alarming b-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Current Opinion in Microbiology* 2010, 13:558–564
24. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(4):933-51
25. Warren A, Townsend KM, King T, Moss S, O'Boyle D, Yates R et al. Multi-drug resistant *Escherichia coli* with extended spectrum b-lactamase activity and fluoroquinolone resistance isolated from clinical infections in dogs. *Aust Vet J*. 2001;79(9):621-3.
26. Hordijk J, Schoormans A, Kwakernaak M. High prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in cats and dogs. *Front Microbiol*. 2013; 4: 242
27. Rzewuska M, Czopowicz M, Swida, Chrobak D, Blaszcak B, Binek M. Multidrug resistance in *Escherichia Coli* strains isolated from infections in Dogs and Cats in Poland (2007-2013). *The Scientific World Journal*. 2014;2015:1-8.
28. Aasmäe B, Volkova J, Häkkinen L, Orro T, Tenson T, Kalmus P. In vitro antimicrobial resistance of intestinal *Escherichia coli* and enterococci in clinically healthy dogs in Estonia. *Veterinarija ir Zootechnika*. 2015;72(94):3-8.

29. Harada K, Morimoto E, Kataoka Y, Takahashi T. Clonal spread of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates among pups in two kennels. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2011;53(11):2011.
30. Cummings KJ, Aprea VA, Altier C. Antimicrobial resistance trends among canine *Escherichia coli* isolates obtained from clinical samples in the northeastern USA, 2004–2011. *Canadian Veterinary Journal*. 2015;56(4):
31. Pedersen K, Pedersen K, Jensen H, Finster K, Jensen VF, Heuer OE. Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;60:775-81
32. Ruiz-Martínez L, López-Jiménez L, Fusté E, Vinuesa T, Martínez JP, Viñas M. Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38(5):398-402
33. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*. 2010;13(6):151-71
34. Poehlsgaard J, Douthwaite S. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(11):870-81
35. Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev*. 2005;105(2):477-98
36. Nam HM, Lee HS, Byun JW, Yoon SC, Jung SC, Joo YS et al. Prevalence of antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates from stray pet dogs and hospitalized pet dogs in Korea. *Micro Drug Resist*. 2010;16(1):75-9.
37. *Escherichia coli* light microscopy. [žiūrēta 2015-11-28] Prieiga per internetą: <<http://www.bacteriainphotos.com/light%20microscopy%20of%20bacteria/Escherichia%20coli%20microscopy.jpg>>
38. *Escherichia coli* on blood agar. [žiūrēta 2015-11-28] Prieiga per internetą: <<http://www.bacteriainphotos.com/photo%20gallery/Escherichia%20coli.jpg>>
39. Kirby-Bauer disk diffusion. *E. coli* on Mueller-Hinton agar. [žiūrēta 2015-11-29] Prieiga per internetą: <http://www.microbeworld.org/index.php?option=com_jlibrary&view=article&task=download&id=12255>